



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0023676

(51)⁷ A61K 39/395; C12N 5/07; C12P 21/08; (13) B
C07K 16/28

(21) 1-2011-03403 (22) 07/05/2010
(86) PCT/US2010/034116 07/05/2010 (87) WO2010/129917 11/11/2010
(30) 61/176,826 08/05/2009 US; 61/325,213 16/04/2010 US
(45) 25/05/2020 386 (43) 25/02/2013 299A
(73) VACCINEX, INC. (US)
1895 Mount Hope Avenue, Rochester, NY 14620, USA
(72) SMITH, Ernest, S. (US); FISHER, Terrence, Lee (US)
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN CHUYỂN Màng CD100,
CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
KHÁNG THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100 và được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó này. Cụ thể, kháng thể đơn dòng kháng CD100 đã được phát triển để trung hòa CD100.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến đề cập đến được phẩm và phương pháp điều trị bệnh liên quan đến CD100, bao gồm một số bệnh tự miễn, bệnh viêm, và ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng CD100 có hoạt tính trung hòa CD100.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD100, còn được gọi là semaphorin 4D (SEMA4D), là một protein chuyển màng (*chẳng hạn*, SEQ ID NO: 1 (người); SEQ ID NO: 2 (chuột)) thuộc họ gen semaphorin. CD100 được biểu hiện trên bề mặt tế bào ở dạng homodime, nhưng sau quá trình hoạt hóa tế bào CD100 có thể được giải phóng từ bề mặt tế bào thông qua quá trình cắt thủy phân proteoin để tạo ra CD100 hoạt động, dạng hòa tan của protein. Tham khảo Suzuki *et al.*, *Nature Rev. Immunol.* 3:159-167 (2003); Kukutani *et al.*, *Nature Immunol.* 9:17-23 (2008).

CD100 lần đầu tiên được xác định bằng cách tạo ra hai kháng thể đơn dòng của chuột, BD16 và BB18, kháng lại dòng tế bào T của người được hoạt hóa (Herold *et al.*, *Int. Immunol.* 7:1-8 (1994)). CD100 là ví dụ đầu tiên về semaphorin được biểu hiện trong hệ miễn dịch. CD100 được biểu hiện nhiều trên bề mặt của tế bào T nghỉ, và biểu hiện yếu trên tế bào B nghỉ, tế bào đơn nhân, và tế bào trình diện kháng nguyên chuyên biệt, như tế bào tua (DC). Quá trình hoạt hóa tế bào có thể điều hòa tăng quá trình biểu hiện trên bề mặt của CD100 trên tế bào B và DC, cũng như quá trình tạo CD100. CD100 được cho là có chức năng như một thụ thể, truyền tín hiệu thông qua vùng nằm trong tế bào chất của nó, và như một phối tử (Hall *et al.*, *PNAS* 93:11780-11785 (1996)). Một trong số các thụ thể được xác định đối với CD100 là Plexin-B1. Plexin-B1 được biểu hiện trong mô không bạch huyết và là một thụ thể ái lực cao (1nM) đối với CD100 (Tamagnone *et al.*, *Cell* 99:71-80 (1999)).

CD100 là một chất trung gian quan trọng trong quá trình hoạt hóa tế bào T và B. Mẫu chuột có đột biến kiểu gen lặn CD100 (CD100^{-/-}) có đáp ứng kháng thể với kháng nguyên phụ thuộc tế bào T bị giảm và khả năng kích hoạt tế bào T bị giảm. Cả hai chức năng này đều được khôi phục sau khi sử dụng CD100 (Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000)).

Ngoài tác dụng đã được chứng minh của CD100 lên tế bào miễn dịch, CD100 cũng đóng vai trò trực tiếp trong quá trình khử myelin hóa và quá trình thoái hóa axon thấy ở bệnh viêm thần kinh. Cơ chế bệnh sinh của bệnh khử myelin hóa do viêm, như MS, bao gồm cả giai đoạn viêm liên quan đến tế bào miễn dịch cũng như các giai đoạn khử myelin hóa và thoái hóa thần kinh. CD100 được biểu hiện trong tế bào thần kinh đệm ít gai của hệ thần kinh trung ương (CNS) và là một chất ức chế quá trình tái tạo axon. Quá trình biểu hiện CD100 được điều hòa tăng ở tế bào thần kinh đệm ít gai ở ngoại biên của tổn thương tủy sống (Moreau-Fauvarque *et al.*, *J. Neuroscience* 23:9229-9239 (2003)). Nuôi cấy tế bào T được hoạt hóa lâu dài biểu hiện CD100 cùng với tiền tế bào thần kinh đa tiềm năng hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai nguyên phát từ não chuột đã kích thích quá trình chết theo chương trình và thúc đẩy sự suy giảm quá trình quá trình kéo dài (Giraudon *et al.*, *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon *et al.*, *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). CD100 đã kích thích quá trình chết theo chương trình của tiền tế bào thần kinh có thể bị ức chế bởi kháng thể kháng CD100 BD16.

Chuột đột biến có kiểu gen lặn CD100 có tính kháng với quá trình phát triển bệnh viêm não tủy do dị ứng thử nghiệm (experimental allergic encephalomyelitis - EAE), đây là mẫu bệnh trên chuột đối với bệnh xơ cứng rải rác (MS) ở người (Kumanogoh *et al.*, *J. Immunol.* 169:1175-1181 (2002)).

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng CD100 gây ra sự suy giảm đỉnh sinh trưởng trong noron, và, trong việc ủng hộ sự liên quan về mặt chức năng của CD100 trong quá trình viêm thần kinh, đã được báo cáo rằng có sự gia tăng nồng độ CD100 trong dịch não tủy (CSF) của bệnh nhân liệt cơ cứng hai chi dưới ở vùng nhiệt đới/bệnh tủy sống đi kèm với HTLV-1 (HAM/TSP). Do đó, có tác dụng có hại trực

tiếp của CD100 lên tính toàn vẹn của tế bào thần kinh đệm ít gai và tiền tế bào thần kinh và CD100 có thể có vai trò bệnh sinh trong quá trình khử myelin hóa. Vì đây là một chất trung gian quan trọng của cả đáp ứng viêm và quá trình khử myelin hóa trực tiếp, cần có các phân tử trung hòa CD100, *chẳng hạn*, kháng thể kháng CD100, để điều trị bệnh viêm và bệnh khử myelin hóa.

CD100 cũng là một phân tử tiền tạo mạch tiềm năng. Quá trình hoạt hóa Plexin-B1 thông qua liên kết với CD100 chuyển hoạt hóa c-Met và kích thích khả năng xâm nhập của tế bào ung thư và kích thích quá trình tạo mạch cả *in vitro* và *in vivo*. Phân tích hóa mô miễn dịch CD100 trong một tập hợp các loại khối u lớn cho thấy quá trình biểu hiện quá mức của CD100 là một hiện tượng rất thường xuyên trong ung thư vùng đầu và cổ, tuyến tiền liệt, đại tràng, vú, và phổi .

Tín hiệu CD100/Plexin B1 cũng được chỉ ra là có khả năng kích thích quá trình di cư của tế bào nội bì và kích thích quá trình di cư của tế bào ung thư (Conrotto *et al.*, *Blood* 105:4321-4329 (2005); Giordano *et al.*, *Nature Cell Biology* 4:720-724 (2002)). Quá trình di cư của tế bào nội bì được kích thích bởi CD100 được ngăn ngừa bởi kháng thể chặn CD100 và quá trình bất hoạt CD100. Bất hoạt quá trình biểu hiện CD100 trong tế bào cacxinom biểu mô vảy vùng đầu và cổ squamous (HNSCC) bằng ARN kẹp tóc ngăn CD100 (shARN) trước khi ghép vào chuột đã gây ra sự giảm nhanh chóng mạch máu khối u và sự sinh trưởng của khối u (Basile *et al.*, *PNAS* 103:9017-9022 (2006)). Các báo cáo mới đây đã chỉ ra mối tương quan chặt chẽ giữa quá trình thâm nhiễm gây viêm của chất nền khối u và mức độ mạch cao. CD100 được tạo ra bởi tế bào viêm có trong vi môi trường của khối u. Trong môi trường không có CD100, khả năng của tế bào ung thư vú tạo thành khối u và di căn bị ảnh hưởng một cách nghiêm trọng, và nguồn CD100 là các đại thực bào đi kèm với khối u (Sierra *et al.*, *JEM* 205:1673-1685 (2008)). Do đó, cần phải có các phân tử trung hòa CD100, *chẳng hạn*, kháng thể kháng CD100, để điều trị ung thư do CD100 gây ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể trung hòa CD100, *chẳng hạn*, kháng thể đơn dòng được làm cho có tính chất giống người, phương pháp sử dụng kháng thể, và phương pháp điều trị tình trạng và bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện CD100.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm và phương pháp điều trị bệnh liên quan đến CD100, bao gồm một số loại bệnh tự miễn, bệnh viêm, ung thư và tạo mạch xâm nhập. Cụ thể, kháng thể đơn dòng kháng CD100 đã được phát triển để trung hòa CD100. MAb 67 của chuột đã chứng minh khả năng chặn hoạt tính CD100 *in vitro*, và, giảm mức độ nghiêm trọng của triệu chứng lâm sàng của viêm não tủy dị ứng thử nghiệm (EAE), viêm khớp do collagen (CIA), và ung thư ở chuột. MAb 2503 là phiên bản được làm cho có tính chất giống người của MAb 67 đã chứng minh ái lực được gia tăng với CD100 của người và chuột và hoạt tính chặn CD100 như MAb 67.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết được phân lập liên kết đặc hiệu với epitop CD100 tương tự như kháng thể đơn dòng đối chứng được chọn từ nhóm bao gồm 2503, 67, hoặc 76.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết được phân lập liên kết đặc hiệu với CD100, trong đó phân tử liên kết ức chế cạnh tranh với kháng thể đơn dòng đối chứng được chọn từ nhóm bao gồm 2503, 67, hoặc 76 trong quá trình liên kết đặc hiệu với CD100.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó là kháng thể đơn dòng 2503, 67, hoặc 76.

Theo một số phương án, kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế sẽ liên kết đặc hiệu với CD100, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 25. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, VH của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm trình tự axit amin tương đồng với, ngoại trừ

20 hoặc ít hơn thay thế axit amin bảo toàn, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 25. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, VH của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, hoặc SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế sẽ liên kết đặc hiệu với CD100, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VL) có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, hoặc SEQ ID NO: 29. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, VL của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm trình tự axit amin tương đồng với, ngoại trừ 20 hoặc ít hơn thay thế axit amin bảo toàn, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, hoặc SEQ ID NO: 29. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, VL của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, hoặc SEQ ID NO: 29.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100, trong đó VH của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm ít nhất một trong số các CDR sau đây: vùng quyết định bổ thể chuỗi nặng theo Chothia-Kabat-1 (VH-CDR1) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 6, vùng quyết định bổ thể chuỗi nặng theo Kabat-2 (VH-CDR2) có trình tự axit amin ngoại trừ bốn hoặc ít hơn bốn thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 7, hoặc vùng quyết định bổ thể chuỗi nặng theo Kabat-3 (VH-CDR3) có trình tự axit amin, ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100, trong đó VL của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm ít nhất một trong số các CDR sau đây: vùng quyết định bổ thể chuỗi nhẹ theo Kabat-1 (VL-CDR1) có trình tự axit amin ngoại trừ bốn hoặc ít hơn bốn thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 14, vùng quyết định bổ thể chuỗi nhẹ theo Kabat-2 (VL-CDR2) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 15, hoặc vùng quyết định

bỏ thể chuỗi nhẹ theo Kabat-3 (VL-CDR3) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 16.

Theo một khía cạnh khác, VH của kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế bao gồm VH-CDR1, VH-CDR2, và VH-CDR3 có trình tự axit amin bao gồm lần lượt SEQ ID NO: 6, 7, và 8, trừ bốn hoặc ít hơn 4 thay thế axit amin bảo toàn ở một hoặc nhiều VH-CDR. Theo một khía cạnh khác, VH-CDR1, VH-CDR2, và VH-CDR3 có trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 6, 7, và 8.

Theo một khía cạnh khác, VL của kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế bao gồm VL-CDR1, VL-CDR2, và VL-CDR3 trình tự axit amin bao gồm lần lượt SEQ ID NO: 14, 15, và 16, trừ bốn hoặc ít hơn 4 thay thế axit amin bảo toàn ở một hoặc nhiều VL-CDR. Theo một khía cạnh khác, VL-CDR1, VL-CDR2, và VL-CDR3 có trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 14, 15, và 16.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100, trong đó VH của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm ít nhất một trong số các CDR sau đây: vùng quyết định bỏ thể chuỗi nặng theo Kabat-1 (VH-CDR1) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 26, vùng quyết định bỏ thể chuỗi nặng theo Kabat-2 (VH-CDR2) có trình tự axit amin ngoại trừ bốn hoặc ít hơn bốn thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 27, hoặc vùng quyết định bỏ thể chuỗi nặng theo Kabat-3 (VH-CDR3) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 28.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100, trong đó VL của kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm ít nhất một trong số các CDR sau đây: vùng quyết định bỏ thể chuỗi nhẹ theo Kabat-1 (VL-CDR1) có trình tự axit amin ngoại trừ bốn hoặc ít hơn bốn thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 30, vùng quyết định bỏ thể chuỗi nhẹ theo Kabat-2 (VL-CDR2) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 31, hoặc vùng quyết định

bỏ thể chuỗi nhẹ theo Kabat-3 (VL-CDR3) có trình tự axit amin ngoại trừ hai hoặc ít hơn hai thay thế axit amin bảo toàn, tương đồng với SEQ ID NO: 32.

Theo một khía cạnh khác, VH của kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế bao gồm VH-CDR1, VH-CDR2, và VH-CDR3 có trình tự axit amin bao gồm lần lượt SEQ ID NO: 26, 27, và 28, trừ bốn hoặc ít hơn 4 thay thế axit amin bảo toàn ở một hoặc nhiều VH-CDR. Theo một khía cạnh khác, VH-CDR1, VH-CDR2, và VH-CDR3 có trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 26, 27, và 28.

Theo một khía cạnh khác, VL của kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế bao gồm VL-CDR1, VL-CDR2, và VL-CDR3 có trình tự axit amin bao gồm lần lượt SEQ ID NO: 30, 31, và 32, trừ bốn hoặc ít hơn 4 thay thế axit amin bảo toàn ở một hoặc nhiều VL-CDR. Theo một khía cạnh khác, VL-CDR1, VL-CDR2, và VL-CDR3 trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 30, 31, và 32.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế sẽ liên kết với CD100 của người và chuột. Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế liên kết đặc hiệu với polypeptit CD100 hoặc mảnh của nó, hoặc biến thể polypeptit CD100 với ái lực đặc trưng bởi hằng số phân ly (K_D) không lớn hơn $5 \times 10^{-2}M$, $10^{-2}M$, $5 \times 10^{-3}M$, $10^{-3}M$, $5 \times 10^{-4}M$, $10^{-4}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-5}M$, $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, $5 \times 10^{-11}M$, $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $5,7 \times 10^{-12}M$, $8,4 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$, hoặc $10^{-15}M$. Theo một số khía cạnh, polypeptit CD100 hoặc mảnh của nó, hoặc biến thể polypeptit CD100 là của người hoặc chuột. Theo một số khía cạnh khác, polypeptit CD100 hoặc mảnh của nó, hoặc biến thể polypeptit CD100 là của người và K_D khoảng $5 \times 10^{-9}M$ đến khoảng $6 \times 10^{-9}M$. Theo một phương án khác nữa, polypeptit CD100 hoặc mảnh của nó, hoặc biến thể polypeptit CD100 là của chuột và K_D là khoảng $1 \times 10^{-9}M$ đến khoảng $2 \times 10^{-9}M$.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế được làm cho có tính chất giống người, được linh trường hóa hoặc khảm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế, và chất mang.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm axit nucleic mã hóa polypeptit VH hoặc VL kháng thể theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, polynucleotit theo sáng chế chứa hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến vector bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ bao gồm vector theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm ở động vật cần điều trị, bao gồm cho động vật sử dụng dược phẩm bao gồm: kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo sáng chế và chất mang được dụng. Theo các phương án khác, bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm là xơ cứng rải rác hoặc viêm khớp.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật cần điều trị, bao gồm cho động vật sử dụng dược phẩm bao gồm: kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo sáng chế và chất mang được dụng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế quá trình tạo mạch ở động vật cần điều trị ung thư, bao gồm việc cho động vật sử dụng dược phẩm bao gồm: kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo sáng chế và chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế ức chế quá trình liên kết của CD100 với thụ thể CD100. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, thụ thể CD100 là Plexin-B1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là giản đồ của thử nghiệm chặn CD100. CD100-His chỉ là ra là liên kết với Plexin B1 trên bề mặt tế bào của dòng tế bào ổn định biểu hiện Plexin B1 (293/Plexin). CD100-His liên kết với Plexin B1 được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng His tag liên hợp với với biotin đã và streptavidin-APC. MAb kháng CD100 có khả năng chặn quá trình liên kết của có khả năng chặn quá trình liên kết của CD100-His với Plexin B1 tạo ra mức độ huỳnh quang thấp hơn đi kèm với tế bào 293/Plexin đo bằng phương pháp đo dòng chảy tế bào.

Fig. 2 thể hiện kết quả của phương pháp đo dòng chảy tế bào đối với kháng thể kháng -His của thỏ + streptavidin-APC (Rb kháng his +sAPC), CD100 của chuột (muCD100 riêng biệt), CD100 của chuột + 0,625µg/ml MAb (isotyp MAb 67, MAb 76, và mIgG), và CD100 của chuột + 0,156µg/ml MAb (isotyp MAb 67, MAb 76, và mIgG) được thử nghiệm trong thử nghiệm chặn CD100 được thể hiện trên Fig. 1. Kháng thể đơn dòng 67 và 76 chặn quá trình liên kết của CD100 của chuột với thụ thể Plexin B1.

Fig. 3 thể hiện kháng thể đơn dòng 67 và 76 chặn quá trình tách ra khỏi đĩa được phủ fibronectin của tế bào B 293/Plexin được kích thích bởi CD100 của chuột, được thể hiện bằng sự gia tăng độ hấp thụ đối với cả hai MAs 67 (67-2) và 76 (76-1) so với isotyp đối chứng.

Fig. 4 thể hiện quá trình điều trị bằng MAb kháng CD100 76 (1X/tuần hoặc 2X/tuần) hoặc MAb 67 (1X/tuần hoặc 2X/tuần) 30mg/kg làm giảm tình trạng EAE thoái lui-trở nặng ở chuột SJL so với điều trị bằng IgG đối chứng của chuột được thể hiện bằng sự giảm điểm số lâm sàng (4A). Kết quả còn được chứng minh bằng cách so sánh mức độ giảm theo tỷ lệ phần trăm theo điểm số trình bình nhóm (Group Mean Score - GMS) đối với từng liệu trình điều trị bằng MAb từ ngày 21 đến khi kết thúc nghiên cứu (4B).

Fig. 5. Thể hiện quá trình điều trị bằng MAb kháng CD100 76 (1X/tuần) hoặc MAb 67 (1X/tuần) 30 mg/kg làm giảm trình tự EAE thoái lui-trở nặng ở chuột SJL so

với điều trị bằng IgG đối chứng của chuột được thể hiện bằng sự giảm điểm số lâm sàng (5A). Kết quả còn được chứng minh bằng cách so sánh mức độ giảm theo tỷ lệ phần trăm theo điểm số trình bình nhóm (GMS) đối với cả hai quá trình điều trị bằng Mab từ ngày 18 đến khi kết thúc nghiên cứu (5B).

Fig. 6. Thể hiện quá trình điều trị bằng MAb kháng CD100 67 30 mg/kg bắt đầu từ ngày thứ 7 sau khi chủng ngừa (1X/tuần) làm giảm tình trạng EAE thoái lui-trở nặng ở chuột SJL so với điều trị bằng IgG đối chứng của chuột được thể hiện bằng sự giảm điểm số lâm sàng.

Fig. 7. Thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA thể hiện tỷ lệ phần trăm (%) chặn quá trình liên kết của 67 được biotin hóa với CD100 của người (7A) hoặc CD100 của chuột (7B) do liên kết cạnh tranh của MAb 2503, MAb 67, hoặc IgG đối chứng.

Fig. 8. Thể hiện kết quả của phương pháp đo dòng chảy tế bào đối với streptavidin-APC (sAPC riêng biệt), CD100 của người (huCD100), CD100 của khỉ đuôi sóc (marmCD100), CD100 của chuột (muCD100), 1,0 μ g isotyp, và 1,0 μ g MAb (67 hoặc 2503) được thử nghiệm trong thử nghiệm chặn CD100 được thể hiện trên Fig. 1. MAb 67 và MAb 2503 chặn quá trình liên kết của CD100 của người (8A), khỉ đuôi sóc (8B), hoặc chuột (8C) với thụ thể Plexin B1.

Fig. 9. Thể hiện sự giảm độ hấp thụ bị chặn gây ra bởi CD100 do quá trình trung hòa CD100 bằng MAb 67, MAb 2503, và IgG đối chứng. MAb kháng CD100 67 và MAb 2503 chặn quá trình tách ra khỏi đĩa được phủ fibronectin của tế bào B 293/Plexin được kích thích bởi CD100 của người (9A) và CD100 của khỉ đuôi sóc (9B).

Fig. 10. Thể hiện sự thay đổi thể tích khối u (mm³) đối với chuột Balb/c kiểu dại và chuột CD100^{-/-} sau khi tiêm 50000 tế bào ung thư đại tràng CT26 vào bắp chân của chuột.

Fig. 11. Thể hiện sự thay đổi thể tích chân trung bình (mm³) đối với chuột Balb/c kiểu dại được điều trị bằng 1mg MAb 67 hoặc 1mg IgG đối chứng của chuột và

Chuột CD100^{-/-} (“KO”) sau khi tiêm 50000 tế bào ung thư CT26 vào bắp chân của chuột.

Fig. 12. Thể hiện phác đồ điều trị chung đối với viêm khớp do collagen (CIA)

Fig. 13. Thể hiện sự giảm quá trình phát triển bệnh viêm khớp ở mẫu chuột bị CIA đối với các nhóm được điều trị bằng 600 μ g MAb 67. Chỉ số viêm khớp (AI) ở chuột được điều trị bằng 600 μ g MAb 67 được so sánh với AI ở chuột được điều trị bằng 600 μ g đối chứng âm (IgG1) và 600 μ g đối chứng dương etanercept (Enbrel®) khi quá trình điều trị bắt đầu vào ngày thứ 20 (13A). Chỉ số viêm khớp (AI) đối với điều trị bằng MAb 67 được so sánh với điều trị bằng đối chứng âm (IgG1) và đối chứng dương etanercept (Enbrel®) khi quá trình điều trị bắt đầu vào ngày thứ 20 hoặc khi AI ≥ 3 (13B).

Fig. 14. Cho thấy ở chuột Balb/c được chủng ngừa bằng globulin gamma của gà liên hợp với (4-hydroxy-3-nitrophenyl) axetyl được kết tủa bằng phen chua (nhôm-/magie- hydroxit) (“NP-CGG”), được điều trị bằng 600 μ g MAb 67 giảm số lượng tế bào B mầm trung tâm (germinal center - GC) (“B220+CD38lowPNA+”) trong lách (SP) và hạch bạch huyết (LN) sau cả lần chủng ngừa đầu tiên (14A) và chủng ngừa thứ phát (14B). Kết quả cũng được chỉ ra đối với chuột CD100^{-/-} và chuột Balb/c được và không được chủng ngừa NP-CGG.

Fig. 15. thể hiện sự thay đổi thể tích khối u (mm³) đối với chuột Balb/c kiểu dại sau khi tiêm 50000 tế bào ung thư đại tràng CT26 vào bắp chân của chuột. Kết quả được thể hiện đối với chuột được tiêm 1mg MAb 67 hàng tuần bắt đầu vào ngày thứ 1 so với chuột được tiêm IgG đối chứng. nghiên cứu được tiến hành cho đến khi đạt mục tiêu làm chậm quá trình sinh trưởng của khối u.

Fig. 16. thể hiện sự thay đổi thể tích khối u (mm³) đối với chuột Balb/c kiểu dại và chuột CD100^{-/-} (“SEMA4D^{-/-}”) sau khi 50000 tế bào ung thư nguyên bào sợi BCA34 được tiêm dưới da vào cùng bụng của chuột (16A). Mức độ thay đổi thể tích đùi trung bình (mm³) được chỉ ra đối với chuột Balb/c kiểu dại được điều trị bằng 1mg

MAB 67 hoặc 1mg IgG đối chứng của chuột sau khi 50000 tế bào ung thư nguyên bào sợi BCA34 được tiêm vào bắp chân của chuột (16B).

Fig. 17. thể hiện sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) đối với chuột Balb/c kiểu dại và chuột CD100-/- ("SEMA4D-/-") sau khi 50000 tế bào ung thư cacxinom vú EMT6 được tiêm vào bắp chân của chuột.

Fig. 18. thể hiện sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) đối với chuột is shown for athymic nude mice sau khi hai khối u vùng đầu và cổ HN12/chuột được tiêm vào cơ sườn của chuột. Kết quả được thể hiện đối với chuột được tiêm 1mg MAb 2503 hàng tuần bắt đầu vào ngày thứ 1 sau khi ghép so với chuột được tiêm IgG4 đối chứng.

Fig. 19. thể hiện sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) đối với athymic nude mice sau khi hai khối u vùng đầu và cổ HN6 HIF1a mODD được tiêm vào bắp chân của chuột. Kết quả được thể hiện đối với chuột được tiêm 1mg MAb 2503 hàng tuần bắt đầu vào ngày thứ 1 sau khi ghép so với chuột được tiêm IgG4 đối chứng (19A). Hình ảnh về các khối u tiêu biểu từ chuột được điều trị bằng IgG4 đối chứng và MAb 2503 được thể hiện trên Fig. (19B).

Fig. 20. Thể hiện kết quả tỷ lệ phần trăm bão hòa của phân tích bão hòa sau khi tiêm qua tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 ở chuột. Chuột Sprague-Dawley được tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 ở các liều lượng 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10, và 100mg/kg. Thử nghiệm bão hòa dựa trên phương pháp đo dòng chảy tế bào được thực hiện trên mẫu máu toàn phần được gây tan ở các thời điểm khác nhau để xác định tỷ lệ phần trăm đích tế bào (SEMA4D) được bão hòa bằng MAb 2503 ở chuột đực (20A) và chuột cái (20B).

Fig. 21. Thể hiện kết quả tỷ lệ phần trăm bão hòa của phân tích bão hòa sau khi tiêm qua tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 ở khỉ. Khỉ được tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 ở các liều lượng 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10, và 100mg/kg. Thử nghiệm bão hòa dựa trên phương pháp đo dòng chảy tế bào được thực hiện trên mẫu máu toàn phần được gây tan ở các thời điểm khác nhau để xác định tỷ lệ phần trăm

đích tế bào (SEMA4D) được bão hòa bằng MAb 2503 (kết quả của khi đực và khi cái được tổ hợp với nhau).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Cần chú ý rằng thuật ngữ “một” dùng để chỉ một hoặc nhiều; chẳng hạn, “một kháng thể kháng CD100” sẽ được hiểu là một hoặc nhiều kháng thể kháng CD100. Do đó, thuật ngữ “một”, “một hoặc nhiều,” và “ít nhất một” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khối u” dùng để chỉ quá trình tăng sinh và sinh trưởng của tế bào ung thư, cả ác tính hoặc lành tính, và tất cả các mô và tế bào ung thư và tiền ung thư.

“Quá trình tạo mạch xâm nhập” dùng để chỉ sự hình thành mạch máu để hỗ trợ các tình trạng bệnh lý, bao gồm khối u ác tính và không ác tính cũng như sự hình thành bất thường của mạch máu mới trong quá trình thoái hóa điểm vàng.

Thuật ngữ, “ung thư” dùng để chỉ hoặc mô tả tình trạng bệnh lý ở động vật có vú thường được đặc trưng bởi quá trình sinh trưởng tế bào không được điều hòa. Ví dụ về ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở cacxinoma, u lympho và bệnh bạch cầu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit” dùng để chỉ một “polypeptit” cũng như nhiều “polypeptit,” và dùng để chỉ phân tử bao gồm monome (axit amin) được liên kết thẳng với nhau bằng liên kết amit (còn được gọi là liên kết peptit). Thuật ngữ “polypeptit” dùng để một hoặc nhiều chuỗi bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai axit amin, và không dùng để chỉ một sản phẩm có độ dài cụ thể. Do đó, peptit, dipeptit, tripeptit, oligopeptit, “protein,” “chuỗi axit amin,” hoặc một thuật ngữ bất kỳ khác được sử dụng để chỉ chuỗi gồm hai hoặc nhiều hơn hai axit amin, bao gồm trong định nghĩa về “polypeptit,” và thuật ngữ “polypeptit” có thể được sử dụng thay thế bởi các thuật ngữ bất kỳ khác. Thuật ngữ “polypeptit” cũng dùng để chỉ sản phẩm của quá

trình biến đổi polypeptit sau biểu hiện, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở glycosyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, tạo dẫn xuất bằng nhóm bảo vệ/nhóm phong bế đã biết, cắt phân giải protein, hoặc biến đổi bằng các axit amin không có trong tự nhiên. Polypeptit có thể thu được từ một nguồn tự nhiên hoặc sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp, nhưng không cần thiết phải được dịch mã từ một trình tự axit nucleic đã biết. Có thể tạo ra theo một phương pháp bất kỳ, bao gồm tổng hợp hóa học.

Polypeptit theo sáng chế có thể có kích thước là khoảng 3 hoặc nhiều hơn, 5 hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 25 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn, 75 hoặc nhiều hơn, 100 hoặc nhiều hơn, 200 hoặc nhiều hơn, 500 hoặc nhiều hơn, 1000 hoặc nhiều hơn, hoặc 2000 hoặc nhiều hơn axit amin. Polypeptit có thể có cấu trúc 3 chiều xác định, mặc dù không cần thiết phải có cấu trúc này. Polypeptit có cấu trúc 3 chiều xác định được đề cập như được xoắn, và polypeptit không có cấu trúc 3 chiều xác định, nhưng có thể có nhiều cấu hình khác nhau được gọi là dạng không được xoắn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ glycoprotein dùng để chỉ protein liên kết với ít nhất một gốc carbohydrat gắn với protein qua chuỗi bên chứa oxy hoặc nitơ của axit amin, *chẳng hạn*, serin hoặc asparagin.

Thuật ngữ polypeptit “được phân lập” hoặc mảnh, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó dùng để chỉ polypeptit không phải ở trạng thái tự nhiên. Không bắt buộc phải có một mức độ tinh khiết cụ thể. Chẳng hạn, polypeptit được phân lập có thể được tác ra khỏi môi trường nguyên gốc hoặc môi trường tự nhiên của nó. Polypeptit và protein được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào chủ được coi là được phân lập theo sáng chế, cũng như polypeptit tái tổ hợp hoặc nguyên gốc đã được phân tách, phân đoạn, hoặc được tinh chế một phần hoặc gần như hoàn toàn bằng một kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

Cũng được coi là polypeptit theo sáng chế là mảnh, dẫn xuất, đồng phân, hoặc biến thể của polypeptit, và một hỗn hợp bất kỳ của nó. Thuật ngữ “mảnh,” “biến thể,” “dẫn xuất,” và “đồng phân” khi đề cập đến kháng thể kháng CD100 hoặc polypeptit kháng thể theo sáng chế là một polypeptit bất kỳ vẫn giữ được ít nhất một vài hoạt tính

liên kết với kháng nguyên của kháng thể hoặc polypeptit kháng thể tương ứng theo sáng chế. Mảnh của polypeptit theo sáng chế bao gồm mảnh được tạo ra do phân giải protein, cũng như mảnh tạo ra do bị mất một phần, ngoài mảnh kháng thể đặc hiệu được đề cập trong bản mô tả này. Biến thể của polypeptit kháng thể và kháng thể kháng CD100 theo sáng chế bao gồm mảnh như đã đề cập, và polypeptit có trình tự axit amin bị biến đổi do xen, thay thế hoặc loại bỏ axit amin. Biến thể có thể có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp. Biến thể không có nguồn gốc tự nhiên có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật gây đột biến đã biết bất kỳ. Biến thể polypeptit có thể bao gồm đột biến thêm, thay thế hoặc loại bỏ axit amin bảo toàn hoặc không bảo toàn. Biến thể polypeptit cũng có thể được gọi là “đồng phân polypeptit” trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dẫn xuất” của kháng thể kháng CD100 hoặc polypeptit kháng thể dùng để chỉ polypeptit có một hoặc nhiều gốc được tạo dẫn xuất tổng hợp bằng phản ứng của chuỗi bên. Cũng được coi là “dẫn xuất” là peptit chứa một hoặc nhiều dẫn xuất axit amin có nguồn gốc tự nhiên của 20 axit amin tiêu chuẩn. Chẳng hạn, 4-hydroxyprolin có thể được thế cho prolin; 5-hydroxylyzin có thể được thế cho lyzin; 3-metylhistidin có thể được thế cho histidin; homoserin có thể được thế cho serin; và ornitin có thể được thế cho lyzin. Dẫn xuất của polypeptit kháng thể và kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, có thể bao gồm polypeptit đã được biến đổi để có các đặc tính bổ trợ không có ở kháng thể hoặc polypeptit kháng thể đối chứng theo sáng chế.

Thuật ngữ “polynucleotit” dùng để chỉ một axit nucleic cũng như nhiều axit nucleic, và dùng để chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, *chẳng hạn*, ARN thông tin (mARN) hoặc ADN plasmit (pADN). Polynucleotit có thể có liên kết phosphodiester thông thường hoặc liên kết không thông thường (*chẳng hạn*, liên kết amit, như thấy trong peptit axit nucleic (PNA)). Thuật ngữ “axit nucleic” dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic, *chẳng hạn*, mảnh ADN hoặc ARN, có trong polynucleotit. Axit nucleic hoặc polynucleotit “được phân lập” dùng để chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, đã được tách khỏi môi trường phát sinh của nó. Chẳng hạn, polynucleotit tái tổ hợp mã hó phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trong vector được coi là phân lập theo

sáng chế. Ví dụ về polynucleotit được phân lập bao gồm polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong tế bào chủ khác loại hoặc polynucleotit tinh khiết (một phần hoặc gần như hoàn toàn) trong dung dịch. Phân tử ARN được phân lập bao gồm bản sao mã ARN *in vivo* hoặc *in vitro* của polynucleotit theo sáng chế. Polynucleotit hoặc axit nucleic được phân lập theo sáng chế còn bao gồm các phân tử được tạo ra theo phương pháp tổng hợp. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể bao gồm yếu tố điều hòa như đoạn khởi đầu, vị trí gắn ribosom, hoặc yếu tố kết thúc phiên mã.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vùng mã hóa” là một phần của axit nucleic bao gồm mã bộ ba được dịch mã thành axit amin. Mặc dù “mã bộ ba kết thúc” (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nhưng có thể được coi là một phần của vùng mã hóa, nhưng các trình tự ở cạnh bất kỳ, chẳng hạn đoạn khởi đầu, vị trí gắn ribosom, yếu tố kết thúc phiên mã, intron, và các trình tự tương tự, không phải là bộ phận của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều hơn hai vùng mã hóa theo sáng chế có thể có trong một cấu trúc polynucleotit, *chẳng hạn*, trên một vectơ, hoặc ở các cấu trúc polynucleotit riêng biệt, *chẳng hạn*, trên các vectơ riêng biệt (khác nhau). Hơn nữa, một vectơ bất kỳ có thể chứa vùng mã hóa, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai vùng mã hóa, *chẳng hạn*, một vectơ có thể mã hóa một cách riêng biệt vùng biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Ngoài ra, vectơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa các vùng mã hóa khác loại, được dung hợp hoặc không được dung hợp với axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD100 hoặc mảnh, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó. Vùng mã hóa khác loại bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các yếu tố hoặc đoạn lặp lại đặc biệt, như pepti tín hiệu quá trình tiết hoặc vùng chức năng khác loại.

Theo một số phương án, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Trong trường hợp ADN, polynucleotit bao gồm axit nucleic mã hóa polypeptit thường có thể bao gồm đoạn khởi đầu và/hoặc các yếu tố kiểm soát quá trình phiên mã hoặc dịch mã khác được liên kết linh động với một hoặc nhiều vùng mã hóa. Liên kết linh động là khi vùng mã hóa đối với một sản phẩm gen, *chẳng hạn*, polypeptit, được liên kết với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách để đặt quá trình biểu hiện của sản phẩm gen dưới sự tác động hoặc kiểm soát của trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng

mã hóa polypeptit và đoạn khởi đầu liên kết với nó) là “được liên kết linh động” nếu quá trình kích hoạt chức năng của đoạn khởi đầu sẽ gây ra quá trình phiên mã mRNA mã hóa của sản phẩm gen mong muốn và nếu như bản nhất của liên kết giữa hai mảnh ADN không ảnh hưởng đến khả năng kiểm soát quá trình biểu hiện sản phẩm gen của trình tự điều hòa quá trình biểu hiện hoặc ảnh hưởng đến khả năng được phiên mã của khuôn ADN. Do đó, đoạn khởi đầu sẽ được liên kết linh động với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu đoạn khởi đầu có khả năng ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của axit nucleic đó. Đoạn khởi đầu có thể là đoạn khởi đầu đặc biệt với tế bào điều khiển quá trình phiên mã của ADN chỉ trong một số loại tế bào định trước. Các yếu tố kiểm soát phiên mã khác, ngoài đoạn khởi đầu, chẳng hạn như yếu tố tăng cường, yếu tố điều hòa, yếu tố ức chế, và tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được liên kết linh động với polynucleotit để điều khiển quá trình phiên mã đặc hiệu với tế bào. Đoạn khởi đầu và vùng kiểm soát phiên mã thích hợp được đề cập trong bản mô tả này.

Một loạt các vùng kiểm soát phiên mã đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng kiểm soát này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng kiểm soát phiên mã hoạt động trong tế bào động vật có xương sống, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, đoạn khởi đầu và đoạn yếu tố tăng cường của cytomegalovirut (đoạn khởi đầu sớm ngay lập tức, cùng với intron-A), simian virut 40 (đoạn khởi đầu sớm), và retrovirut (như Rous sarcoma virut). Các vùng kiểm soát phiên mã khác bao gồm vùng kiểm soát phiên mã thu được từ gen của động vật có xương sống actin, protein sốc nhiệt, hormone sinh trưởng của bò và β -globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát quá trình biểu hiện gen trong tế bào có nhân điển hình. Vùng kiểm soát phiên mã thích hợp bao gồm đoạn khởi đầu và yếu tố tăng cường đặc hiệu mô cũng như đoạn khởi đầu có khả năng kích thích lymphokin (*chẳng hạn*, đoạn khởi đầu có thể kích thích được bằng interferon hoặc interleukin).

Tương tự, một loạt yếu tố khả năng dịch mã đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vị trí gắn ribosom, mã bộ ba khởi đầu và kết thúc quá trình dịch mã, và các yếu tố thu được từ picoARNvirut (cụ thể là vị trí đi vào ribosom nội bào, hoặc IRES, còn được gọi là trình tự CITE).

Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, chẳng hạn, ở dạng ARN thông tin (mARN).

Vùng mã hóa của polynucleotit và axit nucleic theo sáng chế có thể được liên kết với vùng mã hóa khác mã hóa peptit tín hiệu hoặc peptit tiết, điều khiển quá trình tiết của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Theo giả thuyết tín hiệu, protein được tiết bởi tế bào động vật có vú có peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu quá trình tiết được phân cắt từ protein trưởng thành khi quá trình xuất chuỗi protein đang hình thành qua lưới nội chất hạt được khởi động. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu rằng polypeptit được tiết ra bởi tế bào động vật có xương sống thường có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu N của polypeptit, được cắt từ polypeptit đầy đủ hoặc “nguyên vẹn” để tạo ra dạng được tiết hoặc dạng “trưởng thành” của polypeptit. Theo một số phương án, peptit tín hiệu gốc, *chẳng hạn*, peptit tín hiệu chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch sẽ được sử dụng, hoặc dẫn xuất hoạt động của trình tự đó vẫn giữ được khả năng điều khiển quá trình tiết của polypeptit được liên kết linh động với nó. Theo một cách khác, peptit tín hiệu khác loại của động vật có vú, hoặc dẫn xuất hoạt động của nó, có thể được sử dụng. Chẳng hạn, trình tự dẫn đầu kiểu đại có thể được thay thế bằng trình tự dẫn đầu của yếu tố hoạt hóa plasminogen mô (TPA) hoặc β -glucuronidaza của chuột.

“Phân tử liên kết” hoặc “phân tử liên kết kháng nguyên” theo sáng chế được sử dụng theo nghĩa rộng nhất dung để chỉ phân tử liên kết đặc hiệu với quyết định kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử liên kết liên kết đặc hiệu với CD100, *chẳng hạn*, polypeptit chuyển màng CD100 có trọng lượng khoảng 150kDa hoặc polypeptit CD100 tan có trọng lượng khoảng 120kDa (thường được gọi là CD100). Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất một CDR chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất hai CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất ba CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất bốn CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể.

Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất năm CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất sáu CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể.

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó. Trừ khi đề cập cụ thể đến kháng thể nguyên vẹn như kháng thể có nguồn gốc tự nhiên, thuật ngữ “kháng thể kháng CD100” bao gồm kháng thể nguyên vẹn cũng như mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, đồng phân, hoặc dẫn xuất của kháng thể này, *chẳng hạn*, có nguồn gốc tự nhiên kháng thể hoặc phân tử globulin miễn dịch hoặc phân tử kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với kháng nguyên theo kiểu tương tự với phân tử kháng thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể “của người” hoặc “hoàn toàn của người” bao gồm kháng thể có trình tự axit amin của globulin miễn dịch của người và bao gồm kháng thể được phân lập từ ngân hàng globulin miễn dịch của người hoặc động vật chuyển gen một hoặc nhiều globulin miễn dịch của người và không biểu hiện globulin miễn dịch nội sinh, như được đề cập trong tài liệu đã dẫn, *chẳng hạn*, trong U.S. Pat. No. 5,939,598 của Kucherlapati *et al.* kháng thể “của người” hoặc “hoàn toàn của người” cũng bao gồm kháng thể bao gồm ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng, hoặc ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi có trình tự axit amin của vùng biến đổi globulin miễn dịch của người.

Kháng thể “của người” hoặc “hoàn toàn của người” cũng bao gồm kháng thể “của người” hoặc “hoàn toàn của người”, như đã đề cập, chứa, chứa chủ yếu, hoặc bao gồm, biến thể (bao gồm dẫn xuất) của phân tử kháng thể (*chẳng hạn*, vùng VH và/hoặc vùng VL) được đề cập trong bản mô tả này, kháng thể hoặc mảnh của nó liên kết đặc hiệu miễn dịch với polypeptit CD100 hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Các kỹ thuật chuẩn đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để đưa đột biến vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể người kháng CD100, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gây đột biến đặc hiệu vị trí và gây đột biến bằng PCR có thể tạo ra các thay thế axit amin. Tốt hơn, nếu biến thể (bao gồm dẫn xuất) mã hóa ít hơn 50 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 40 đột biến thay thế axit amin, ít hơn

30 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 25 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 20 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 15 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 10 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 5 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 4 đột biến thay thế axit amin, ít hơn 3 đột biến thay thế axit amin, hoặc ít hơn 2 đột biến thay thế axit amin so với trình tự vùng VH, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, vùng VL, VLCDR1, VLCDR2, hoặc VLCDR3 gốc.

Theo một số phương án, đột biến thay thế axit amin là thay thế axit amin bảo toàn, sẽ được đề cập rõ hơn ở đây. Theo một cách khác, đột biến có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên dọc theo toàn bộ hoặc một phần của trình tự mã hóa, như bằng phương pháp gây đột biến bão hòa, và thể đột biến hình thành có thể được sàng lọc hoạt tính sinh học để xác định thể đột biến vẫn giữ được hoạt tính (chẳng hạn, khả năng liên kết với polypeptit CD100, *chẳng hạn*, CD100 CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột). Các biến thể (hoặc dẫn xuất) của kháng thể “của người” hoặc “hoàn toàn của người” cũng có thể được gọi là kháng thể của người hoặc hoàn toàn của người được “tối ưu” hoặc “được tối ưu khả năng liên kết với kháng nguyên” và bao gồm kháng thể có ái lực với kháng nguyên được gia tăng.

Thuật ngữ “kháng thể” và “globulin miễn dịch” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Kháng thể hoặc globulin miễn dịch bao gồm ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng, và thường bao gồm ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Cấu trúc globulin miễn dịch cơ bản trong hệ động vật có xương sống đã được biết khá rõ. Tham khảo, *chẳng hạn*, Harlow et al. (1988) *Antibody: A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Như sẽ được đề cập chi tiết hơn dưới đây, thuật ngữ “globulin miễn dịch” bao gồm nhiều lớp polypeptit khác nhau có thể được phân biệt về mặt hóa sinh. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng chuỗi nặng được phân loại thành gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) với một số phân lớp trong đó (*chẳng hạn*, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Do bản chất của chuỗi này sẽ quyết định “lớp” kháng thể là IgG, IgM, IgA, IgG, hoặc IgE. Các phân lớp globulin miễn dịch (isotyp) *chẳng hạn*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, v.v đã được xác định đặc điểm kỹ và được cho là tạo ra sự

đặc hiệu chức năng. Các phiên bản được biến đổi của từng phân tử trong các lớp và isotyp là biết rõ với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này khi tham khảo bản mô tả và, do đó, sẽ thuộc vào phạm vi của sáng chế. Tất cả các lớp globulin miễn dịch rõ ràng thuộc vào phạm vi của sáng chế, phần thảo luận sau đây sẽ đề cập đến lớp IgG của phân tử globulin miễn dịch. Về IgG, một phân tử globulin miễn dịch tiêu chuẩn bao gồm hai polypeptit chuỗi nhẹ giống nhau có trọng lượng phân tử khoảng 23000 Dalton, và hai polypeptit chuỗi nặng giống nhau có trọng lượng phân tử 53000 đến 70000. Bốn cuối thường được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfite theo cấu hình “Y” trong đó chuỗi nhẹ gắn với chuỗi nặng bắt đầu từ phần mở của chữ “Y” và kéo dài liên tục hết vùng biến đổi.

Chuỗi nhẹ được phân loại thành kappa hoặc lambda (κ , λ). Mỗi lớp chuỗi nặng có thể được gắn với chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Nói chung, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết đồng hóa trị với nhau, và phần “đuôi” của hai chuỗi nặng được gắn với nhau bởi các liên kết disulfite đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị khi globulin miễn dịch được tạo ra bởi tế bào lai, tế bào B hoặc tế bào chủ được biến đổi di truyền. Trong chuỗi nặng, trình tự axit amin chạy từ đầu N ở đầu phân nhánh của cấu hình Y đến đầu C ở cuối mỗi chuỗi.

Cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đều được chia thành các vùng có độ tương đồng về cấu trúc và chức năng. Thuật ngữ “cố định” và “biến đổi” được sử dụng theo nghĩa chức năng. Liên quan đến vấn đề này, có thể hiểu rằng vùng biến đổi của cả chuỗi nhẹ (VL hoặc VK) và chuỗi nặng (VH) sẽ quyết định khả năng nhận diện và độ đặc hiệu với kháng nguyên. Ngược lại, vùng cố định của chuỗi nhẹ (CL) và chuỗi nặng (CH1, CH2 hoặc CH3) sẽ tạo ra đặc tính sinh học quan trọng như khả năng tiết, khả năng vận chuyển qua bào thai, liên kết với thụ thể Fc, liên kết bổ thể, và các hoạt tính tương tự. Thông thường, số thứ tự của vùng cố định sẽ tăng lên khi chúng càng xa vị trí liên kết kháng nguyên hoặc đầu amin của kháng thể. Phần đầu N là vùng biến đổi và phân ở đầu C là vùng cố định; vùng CH3 và CL thực sự bao gồm đầu carboxy của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Như đã nêu, vùng biến đổi cho phép kháng thể nhận diện chọn lọc và liên kết đặc hiệu với epitop trên kháng nguyên. Nghĩa là, vùng VL và vùng VH, hoặc một nhóm vùng quyết định bổ thể (CDR) trong các vùng biến đổi này, của kháng thể tổ hợp với nhau để tạo thành vùng biến đổi xác định vị trí liên kết kháng nguyên ba chiều. Cấu trúc kháng thể bậc bốn sẽ tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên có ở đầu mỗi nhánh của hình chữ Y. Cụ thể hơn, vị trí liên kết kháng nguyên được xác định bởi ba CDR trên mỗi chuỗi VH và VL. Trong một số trường hợp, *chẳng hạn*, một số phân tử globulin miễn dịch thu được từ loài camelid hoặc được biến đổi dựa trên globulin miễn dịch của camelid, phân tử globulin miễn dịch hoàn chỉnh có thể chỉ bao gồm chuỗi nặng, và không có chuỗi nhẹ. Tham khảo, *chẳng hạn*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

Trong kháng thể có nguồn gốc tự nhiên, sáu “vùng quyết định bổ thể” hoặc “CDR” có trong mỗi phần liên kết kháng nguyên là các trình tự axit amin ngắn, không liên tục được đặt ở các vị trí đặc hiệu để tạo ra phần liên kết kháng nguyên khi kháng thể có cấu hình ba chiều trong môi trường lỏng. Phần còn lại của axit amin trong phần liên kết kháng nguyên, được gọi là “vùng khung”, cho thấy mức độ biến đổi giữa các phân tử thấp hơn. Vùng khung thường sử dụng cấu hình gấp nếp β và CDR tạo thành các vòng nổi, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của cấu trúc gấp nếp β . Do đó, vùng khung đóng vai trò tạo thành một bộ khung tạo ra vị trí gắn của CDR theo hướng chính xác bằng các liên kết không đồng hóa trị giữa các chuỗi với nhau. Phần liên kết kháng nguyên được tạo ra bởi các CDR được sắp xếp sẽ xác định bổ thể bề mặt đối với epitop trên kháng nguyên có hoạt tính miễn dịch. Bề mặt bổ thể này sẽ kích thích quá trình liên kết đồng hóa trị của kháng thể với epitop. Axit amin có trong CDR và vùng khung có thể xác định được một cách dễ dàng đối với một vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ nhất định bởi một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, vì chúng đã được xác định một cách chính xác (xem dưới đây).

Trong trường hợp khi có hai hoặc nhiều hơn hai định nghĩa của cùng một thuật ngữ được sử dụng và/hoặc chấp nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này, định nghĩa của thuật ngữ Như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm tất cả các nghĩa trên trừ khi được chỉ ra ngược lại một cách tường minh. Một ví dụ cụ thể là việc sử dụng thuật ngữ

“vùng quyết định bổ thể” (“CDR”) để mô tả vị kết hợp kháng nguyên không liên tục có trong vùng biến đổi của cả polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vùng đặc biệt này đã được mô tả bởi Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Protein of Immunological Interest” và bởi Chothia và Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), trong đó định nghĩa bao gồm sự trùng lặp hoặc tập con các gốc axit amin khi được so sánh với nhau. Tuy nhiên, việc ứng dụng một trong hai định nghĩa để chỉ CDR của kháng thể hoặc biến thể của nó thuộc vào phạm vi của các thuật ngữ được định nghĩa và sử dụng trong bản mô tả này. Các gốc axit amin thích hợp dùng để chỉ CDR như được định nghĩa bởi từng tài liệu tham khảo được viện dẫn trên được nêu trong bảng 1 dưới đây. Số lượng gốc chính xác có trong một CDR cụ thể sẽ khác nhau phụ thuộc vào trình tự và kích thước của CDR. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định gốc vào có trong một CDR cụ thể dựa vào trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể.

Bảng 1. Định nghĩa CDR¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31 đến 35	26 đến 32
VH CDR2	50 đến 65	52 đến 58
VH CDR3	95 đến 102	95 đến 102
VL CDR1	24 đến 34	26 đến 32
VL CDR2	50 đến 56	50 đến 52
VL CDR3	89 đến 97	91 đến 96

¹Số thứ tự của tất cả các CDR trong bảng 1 là theo phương pháp đánh số được đề xuất bởi Kabat et al. (xem dưới đây).

Kabat *et al.* cũng xác định hệ thống đánh số đối với các trình tự vùng biến đổi có thể sử dụng được cho một kháng thể bất kỳ. Một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể gán hệ thống “đánh số Kabat” cho một trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không cần dựa vào kết quả thử nghiệm của bản thân trình tự đó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “đánh số Kabat” dùng để chỉ hệ thống đánh số được mô tả bởi

Kabat *et al.* (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Protein of Immunological Interest." Trừ khi được quy định khác, tham chiếu đối với việc đánh số vị trí axit amin đặc hiệu trong kháng thể kháng CD100 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế là theo hệ thống đánh số Kabat.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đa dòng, đơn dòng, đa đặc hiệu, của người, được làm cho có tính chất giống người, được linh trưởng hóa, hoặc kháng thể khảm, kháng thể một chuỗi, mảnh liên kết epitop, *chẳng hạn*, Fab, Fab' và F(ab')₂, Fd, Fvs, Fv một chuỗi (scFv), Fv được liên kết disulfit (sdFv), mảnh bao gồm vùng VL hoặc vùng VH, mảnh được sản xuất bằng phương pháp biểu hiện ngân hàng Fab, và kháng thể kháng idiotypic (anti-Id) (bao gồm, *chẳng hạn*, kháng thể kháng Id kháng kháng thể kháng CD100 được đề cập trong bản mô tả này). Các phân tử ScFv đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề cập, *chẳng hạn*, trong U.S. Pat. No. 5,892,019. Globulin miễn dịch hoặc phân tử kháng thể theo sáng chế có thể thuộc loại bất kỳ (*chẳng hạn*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, và IgY), lớp bất kỳ (*chẳng hạn*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2, v.v.), hoặc phân lớp phân tử globulin miễn dịch bất kỳ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần chuỗi nặng" bao gồm trình tự axit amin thu được từ chuỗi nặng globulin miễn dịch. Polypeptit bao gồm phần chuỗi nặng bao gồm ít nhất một trong số: vùng CH1, vùng bản lề (*chẳng hạn*, vùng bản lề trên, giữa và/hoặc thấp), vùng CH2, vùng CH3, hoặc biến thể hoặc mảnh của nó. *Chẳng hạn*, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH1; chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH1, ít nhất một phần của vùng bản lề, và vùng CH2; chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH1 và vùng CH3; chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH1, ít nhất một phần của vùng bản lề, và vùng CH3, hoặc chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH1, ít nhất một phần của vùng bản lề, vùng CH2, và vùng CH3. Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH3. Hơn nữa, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể thiếu ít nhất một phần của vùng CH2 (*chẳng hạn*, tất cả hoặc một phần của vùng CH2). *như đã nêu*, một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu rằng các vùng này (*chẳng hạn*, phần

chuỗi nặng) có thể được biến đổi sao cho chúng khác nhau về trình tự axit amin so với phân tử globulin miễn dịch có nguồn gốc tự nhiên.

Trong một số kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được đề cập trong bản mô tả này, phần chuỗi nặng của một chuỗi polypeptit của một đa phân là giống với phần chuỗi nặng trên một chuỗi polypeptit thứ hai của đa phân đó. Theo một cách khác, đơn phân chứa phần chuỗi nặng theo sáng chế không giống nhau. Chẳng hạn, mỗi đơn phân có thể bao gồm vị trí liên kết với đích khác nhau, tạo ra, chẳng hạn, kháng thể lưỡng đặc hiệu.

Phần chuỗi nặng của phân tử liên kết được sử dụng trong phương pháp chẩn đoán và điều trị được đề cập trong bản mô tả này có thể thu được từ các phân tử globulin miễn dịch khác nhau. Chẳng hạn, phần chuỗi nặng của polypeptit có thể bao gồm vùng CH1 thu được từ phân tử IgG1 và vùng bản lề thu được từ phân tử IgG3. Theo một ví dụ khác, phần chuỗi nặng có thể bao gồm vùng bản lề thu được, một phần từ phân tử IgG1 và, một phần từ phân tử IgG3. Theo một ví dụ khác, phần chuỗi nặng có thể bao gồm vùng bản lề khảm thu được, một phần, từ phân tử IgG1 và, một phần, từ phân tử IgG4.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phần chuỗi nhẹ” bao gồm trình tự axit amin thu được từ chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, *chẳng hạn*, chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Tốt hơn, nếu phần chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một vùng VL hoặc CL.

Kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được đề cập trong bản mô tả này có thể được mô tả hoặc mô tả cụ thể về epitop hoặc phần của kháng nguyên, *chẳng hạn*, polypeptit đích được đề cập trong bản mô tả này (*chẳng hạn*, CD100) mà kháng thể nhận diện hoặc liên kết đặc hiệu với. Phần của polypeptit đích tương tác đặc hiệu với phần liên kết kháng nguyên của kháng thể là một “epitop,” hoặc “quyết định kháng nguyên.” Polypeptit đích có thể bao gồm một epitop, nhưng thường bao gồm ít nhất hai epitop, và cũng có thể bao gồm một số lượng epitop bất kỳ, phụ thuộc vào kích thước, cấu hình, và loại kháng nguyên. Hơn

nữa, cần chú ý rằng “epitop” trên polypeptit đích có thể là hoặc có thể bao gồm các yếu tố không polypeptit, *chẳng hạn*, epitop có thể bao gồm chuỗi bên carbohydrat.

Kích thước tối thiểu của peptit hoặc polypeptit epitop đối với kháng thể được cho là khoảng bốn đến năm axit amin. Peptit hoặc polypeptit epitop thường bao gồm ít nhất bảy, tốt hơn, nếu ít nhất chín và tốt nhất, nếu từ ít nhất khoảng 15 đến khoảng 30 axit amin. Vì CDR có thể nhận diện peptit hoặc polypeptit có tính kháng nguyên ở cấu trúc bậc ba, nên axit amin bao gồm epitop không cần phải liên tục, và trong một số trường hợp, thậm chí không cần phải ở trên cùng một chuỗi peptit. Peptit hoặc polypeptit epitop được nhận diện bởi kháng thể kháng CD100 theo sáng chế có thể chứa trình tự ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, tốt hơn, nếu ít nhất 8, ít nhất 9, ít nhất 10, ít nhất 15, ít nhất 20, ít nhất 25, hoặc từ khoảng 15 đến khoảng 30 axit amin liên tục hoặc không liên tục của CD100.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu,” thường dùng để chỉ rằng kháng thể liên kết với epitop qua phần liên kết kháng nguyên của nó, và quá trình liên kết này đòi hỏi mức độ bổ sung sung nhất định giữa phần liên kết kháng nguyên và epitop. Theo định nghĩa này, kháng thể được coi là “liên kết đặc hiệu” với epitop khi nó liên kết với epitop đó, thông qua phần liên kết kháng nguyên của nó dễ dàng hơn so với khi liên kết với một epitop ngẫu nhiên, không liên quan. Thuật ngữ “độ đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả này để định lượng ái lực tương đối nhờ đó một kháng thể liên kết với một epitop nhất định. Chẳng hạn, kháng thể “A” có thể có độ đặc hiệu cao hơn đối với một epitop xác định so với kháng thể “B,” hoặc kháng thể “A” có thể được cho là liên kết với epitop “C” với độ đặc hiệu cao hơn so với khi nó liên kết với epitop “D” có liên quan.

Thuật ngữ “liên kết ưu tiên,” dùng để chỉ kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop với độ đặc hiệu cao hơn so với khi liên kết với epitop có liên quan, tương tự, tương đồng, hoặc đồng phân. Do đó, kháng thể “liên kết ưu tiên” với một epitop nhất định sẽ có khả năng liên kết với epitop đó nhiều hơn so với một epitop có liên quan, mặc dù kháng thể này có thể tương tác chéo với epitop có liên quan.

Ví dụ không hạn chế, kháng thể có thể được coi là liên kết một cách ưu tiên với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với hằng số phân ly (K_D) ít hơn K_D

của kháng thể đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không hạn chế khác, kháng thể có thể được coi là liên kết với kháng nguyên thứ nhất một cách ưu tiên nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực ít hơn ít nhất một bậc độ lớn so với K_D của kháng thể đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không hạn chế khác, kháng thể có thể được coi là liên kết một cách ưu tiên với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực thấp hơn ít nhất hai bậc độ lớn so với K_D của kháng thể đối với epitop thứ hai.

Theo một ví dụ không hạn chế khác, kháng thể có thể được coi là liên kết có thể được coi là liên kết một cách ưu tiên với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với tốc độ phân ly ($k(\text{off})$) ít hơn $k(\text{off})$ của kháng thể đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không hạn chế khác, kháng thể có thể được coi là liên kết một cách ưu tiên với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực thấp hơn ít nhất một bậc độ lớn so với $k(\text{off})$ của kháng thể đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không hạn chế khác, kháng thể có thể được coi là liên kết một cách ưu tiên với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực thấp hơn ít nhất hai bậc độ lớn so với $k(\text{off})$ của kháng thể đối với epitop thứ hai. Kháng thể hoặc hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất được đề cập trong bản mô tả này có thể được coi là liên kết với polypeptit đích được đề cập trong bản mô tả này (*chẳng hạn*, CD100, *chẳng hạn*, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột) hoặc mảnh hoặc biến thể của nó với tốc độ phân ly ($k(\text{off})$) ít hơn hoặc bằng $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$, 10^{-2}sec^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ hoặc 10^{-3}sec^{-1} . More tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế được coi là liên kết với polypeptit đích được đề cập trong bản mô tả này (*chẳng hạn*, CD100, *chẳng hạn*, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột) hoặc mảnh hoặc biến thể của nó với tốc độ phân ly ($k(\text{off})$) ít hơn hoặc bằng $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$, 10^{-4}sec^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$, hoặc 10^{-5}sec^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$, 10^{-6}sec^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ hoặc 10^{-7}sec^{-1} .

Kháng thể hoặc hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất được đề cập trong bản mô tả này được coi là liên kết với polypeptit đích được đề cập trong bản mô tả này (*chẳng hạn*, CD100, *chẳng hạn*, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột) hoặc mảnh hoặc biến thể của nó tốc độ liên kết ($k(\text{on})$) lớn hơn hoặc bằng $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ hoặc $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$. More tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế được coi là liên kết với polypeptit đích được đề cập

trong bản mô tả này (*chẳng hạn*, CD100, *chẳng hạn*, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột) hoặc mảnh hoặc biến thể của nó tốc độ liên kết ($k(\text{on})$) lớn hơn hoặc bằng $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, hoặc $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ hoặc $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

Kháng thể được cho là ức chế cạnh tranh quá trình liên kết của kháng thể đối chứng với một epitop xác định nếu nó liên kết ưu tiên với epitop đó đến mức độ nó sẽ chặn, đến một mức nào đó, quá trình liên kết của kháng thể đối chứng với epitop. Quá trình ức chế cạnh tranh có thể được xác định bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Kháng thể có thể được coi là ức chế cạnh tranh quá trình liên kết của kháng thể đối chứng với một epitop nhất định ít nhất 90%, ít nhất 80%, ít nhất 70%, ít nhất 60%, hoặc ít nhất 50%.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ái lực” dùng để chỉ thông số đo độ mạnh của quá trình liên kết của một epitop với CDR của phân tử globulin miễn dịch. Tham khảo, *chẳng hạn*, Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.) pages 27-28. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ái lực” dùng để chỉ độ ổn định toàn phần của phức hệ giữa globulin miễn dịch và kháng nguyên, nghĩa là, độ mạnh kết hợp chức năng của một hỗn hợp globulin miễn dịch với kháng nguyên. Tham khảo, *chẳng hạn*, Harlow at pages 29-34. Ái lực có liên quan đến cả ái lực của một phân tử globulin miễn dịch trong một hỗn hợp với một epitop đặc hiệu, và cũng liên quan đến hóa trị của globulin miễn dịch và kháng nguyên. Chẳng hạn, tương tác giữa kháng thể đơn dòng lưỡng trị và kháng nguyên có cấu trúc epitop lặp lại cao, như polyme, sẽ có ái lực cao.

Kháng thể kháng CD100 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế may cũng được mô tả hoặc cụ thể hóa về mặt khả năng liên kết chéo. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên kết chéo” dùng để chỉ khả năng của kháng thể, là đặc hiệu đối với một kháng nguyên, phản ứng với kháng nguyên thứ hai; một thông số về sự liên quan giữa hai hợp chất có tính kháng nguyên khác nhau. Do đó, kháng thể có tính liên kết chéo nếu nó liên kết với epitop không phải epitop kích thích sự hình thành chúng. Epitop có hoạt tính liên kết chéo

thường có nhiều đặc tính cấu trúc bổ thể tương tự với epitop kích hoạt, và trong một số trường hợp, thực sự là có độ đặc hiệu cao hơn so với epitop gốc.

Chẳng hạn, một số kháng thể có một mức độ liên kết chéo, ở chỗ chúng liên kết với các epitop không giống nhưng có liên quan, *chẳng hạn*, epitop có độ tương đồng ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, ít nhất 80%, ít nhất 75%, ít nhất 70%, ít nhất 65%, ít nhất 60%, ít nhất 55%, và ít nhất 50% (tính bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề cập trong bản mô tả này) so với epitop đối chứng. Kháng thể có thể được coi là không có khả năng liên kết chéo hoặc ít có khả năng liên kết chéo nếu không liên kết với epitop có độ tương đồng ít hơn 95%, ít hơn 90%, ít hơn 85%, ít hơn 80%, ít hơn 75%, ít hơn 70%, ít hơn 65%, ít hơn 60%, ít hơn 55%, và ít hơn 50% (được tính bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề cập trong bản mô tả này) so với epitop đối chứng. Kháng thể có thể được coi là “có tính đặc hiệu cao” đối với một số epitop, nếu nó không liên kết với một đồng phân, ortholog, hoặc homolog bất kỳ của epitop đó.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế may cũng được đề cập về mặt ái lực liên kết với polypeptit theo sáng chế, *chẳng hạn*, CD100, *chẳng hạn*, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột. Ái lực liên kết được ưu tiên bao gồm ái lực liên kết có hằng số phân ly hoặc Kd ít hơn $5 \times 10^{-2}\text{M}$, 10^{-2}M , $5 \times 10^{-3}\text{M}$, 10^{-3}M , $5 \times 10^{-4}\text{M}$, 10^{-4}M , $5 \times 10^{-5}\text{M}$, 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$, 10^{-6}M , $5 \times 10^{-7}\text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-8}\text{M}$, 10^{-8}M , $5 \times 10^{-9}\text{M}$, 10^{-9}M , $5 \times 10^{-10}\text{M}$, 10^{-10}M , $5 \times 10^{-11}\text{M}$, 10^{-11}M , $5 \times 10^{-12}\text{M}$, 10^{-12}M , $5 \times 10^{-13}\text{M}$, 10^{-13}M , $5 \times 10^{-14}\text{M}$, 10^{-14}M , $5 \times 10^{-15}\text{M}$, hoặc 10^{-15}M . Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế sẽ liên kết với CD100 của người với Kd khoảng 5×10^{-9} đến khoảng 6×10^{-9} . Theo một phương án khác, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế liên kết với CD100 của chuột với Kd khoảng 1×10^{-9} đến khoảng 2×10^{-9} .

Kháng thể kháng CD100 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể là “đa đặc hiệu,” *chẳng hạn*, lưỡng đặc hiệu, đặc hiệu

với ba epitop, hoặc có mức độ đa đặc hiệu lớn hơn, nghĩa là nó có thể nhận diện và liên kết với hai hoặc nhiều hơn hai epitop khác nhau có trên một hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau (*chẳng hạn*, protein) đồng thời. Do đó, liệu kháng thể kháng CD100 là “đơn đặc hiệu” hay “đa đặc hiệu,” *chẳng hạn*, “lượng đặc hiệu,” dùng để chỉ số lượng epitop khác nhau mà polypeptit liên kết tương tác với. Kháng thể đa đặc hiệu có thể là đặc hiệu đối với các epitop khác nhau của một polypeptit đích được đề cập trong bản mô tả này hoặc có thể là đặc hiệu đối với một polypeptit đích cũng như đối với một epitop khác loại, như polypeptit khác loại hoặc vật liệu giá đỡ rắn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “valency” dùng để chỉ số lượng vùng liên kết có thể có, chẳng hạn, phần liên kết kháng nguyên có trong polypeptit liên kết hoặc phân tử liên kết với CD100, chẳng hạn, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Mỗi vùng liên kết sẽ liên kết đặc hiệu với một epitop. Khi polypeptit liên kết hoặc phân tử liên kết với CD100 bao gồm nhiều hơn một vùng liên kết, mỗi vùng liên kết có thể liên kết đặc hiệu với cùng một epitop, đối với kháng thể có hai vùng liên kết, được gọi là “đơn đặc hiệu lưỡng trị,” hoặc với các epitop khác nhau, đối với kháng thể có hai vùng liên kết, được gọi là “lượng đặc hiệu lưỡng trị.” Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng có thể là lưỡng đặc hiệu và lưỡng trị đối với mỗi độ đặc hiệu (termed “kháng thể lưỡng đặc hiệu tứ trị”). Theo một phương án khác, tiểu kháng thể tứ trị hoặc kháng thể bị loại bỏ vùng chức năng cũng có thể được tạo ra.

Kháng thể lưỡng đặc hiệu lưỡng trị, và phương pháp tạo ra chúng, được đề cập, chẳng hạn trong U.S. Pat. No. 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; và U.S. Patent Appl. Publ. Nos. 2003/020734 và 2002/0155537. Kháng thể lưỡng đặc hiệu tứ trị, và phương pháp tạo ra chúng được đề cập, chẳng hạn, trong WO 02/096948 và WO 00/44788. Tham khảo, các công bố PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); U.S. Pat. Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).

Như đã nêu, cấu trúc của tiểu đơn vị và cấu hình ba chiều của vùng cố định của các lớp globulin miễn dịch khác nhau đã được biết rõ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng VH” bao gồm vùng biến đổi ở đầu amino của chuỗi nặng globulin miễn dịch và thuật ngữ “vùng CH1” bao gồm (đầu amin tận cùng) vùng cố định thứ nhất của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Vùng CH1 liền kề với vùng VH và ở đầu amino với vùng bản lề của chuỗi nặng globulin miễn dịch.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “vùng CH2” bao gồm một phần của chuỗi nặng kéo dài, *chẳng hạn*, từ khoảng gốc 244 đến gốc 360 của kháng thể sử dụng phương pháp đánh số thường quy (gốc 244 đến 360, hệ thống đánh số Kabat; và gốc 231 đến 340, hệ thống đánh số EU; tham khảo Kabat EA *et al.*). Vùng CH2 là duy nhất ở chỗ nó không kết cặp gần với các vùng khác. Hơn nữa, hai chuỗi carbohydrate phân nhánh được liên kết ở đầu N được xen vào giữa hai vùng CH2 của phân tử IgG nguyên vẹn. Cũng được biết rõ là vùng CH3 kéo dài từ vùng CH2 đến đầu C của phân tử IgG và bao gồm khoảng 108 gốc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng bản lề” bao gồm một phần của chuỗi nặng gần vùng CH1 với vùng CH2. Vùng bản lề bao gồm khoảng 25 gốc và rất linh động, do đó cho phép hai vùng liên kết kháng nguyên ở đầu N di động một cách độc lập. Vùng bản lề có thể được chi nhỏ thành ba vùng khác nhau: vùng bản lề trên, vùng bản lề giữa, và vùng bản lề thấp (Roux *et al.*, *J. Immunol.* 161:4083 (1998)).

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “liên kết disulfit” bao gồm liên kết đồng hóa trị được tạo thành giữa hai nguyên tử lưu huỳnh. Axit amin cysteine bao gồm nhóm thiol có thể tạo thành liên kết disulfit hoặc cầu nối với nhóm thiol thứ hai. Trong hầu hết các phân tử IgG có nguồn gốc tự nhiên, vùng CH1 và CL được liên kết với nhau bằng liên kết disulfit và hai chuỗi nặng được liên kết với nhau bằng hai liên kết disulfit ở các vị trí tương đương gốc 239 và 242 sử dụng hệ thống đánh số Kabat (vị trí 226 hoặc 229, hệ thống đánh số EU).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể khảm” dùng để chỉ kháng thể bất kỳ trong đó vùng hoặc vị trí có hoạt tính miễn dịch thu được từ loài

thứ nhất và vùng cố định (có thể là nguyên vẹn, một phần hoặc được biến đổi theo sáng chế) thu được từ loài thứ hai. Theo các phương án được ưu tiên, vùng hoặc vị trí liên kết với đích sẽ có nguồn gốc từ một loài không phải người (*chẳng hạn*, chuột hoặc linh trưởng) và vùng cố định là của người (*chẳng hạn*, kháng thể đơn dòng (MAb) 2368 được đề cập trong bản mô tả này).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể được biến đổi” dùng để chỉ kháng thể trong đó vùng biến đổi trong chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ hoặc cả hai sẽ được biến đổi bằng cách thay thế ít nhất một hoặc nhiều CDR từ kháng thể có độ đặc hiệu đã biết và, nếu cần, bằng cách thay thế một phần vùng khung và thay đổi trình tự. Mặc dù CDR có thể thu được từ kháng thể trong cùng một lớp hoặc thậm chí là cùng một phân lớp như kháng thể chứa vùng khung, nhưng cần dự tính rằng CDR sẽ thu được từ kháng thể thuộc lớp khác và tốt hơn là từ kháng thể của một loài khác. Kháng thể được biến đổi trong đó một hoặc nhiều CDR “nhận” thu được từ kháng thể không phải của người có độ đặc hiệu đã biết được ghép vào vùng khung chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của người được gọi là “kháng thể được làm cho có tính chất giống người.” Không cần thiết phải thay thế tất cả CDR bằng toàn bộ CDR của vùng biến đổi cho để thay đổi khả năng liên kết với kháng nguyên của một vùng biến đổi so với vùng biến đổi khác. Nói cách khác, chỉ cần chuyển các gốc cần thiết để duy trì hoạt tính của vị trí liên kết với đích.

Còn biết được rằng vùng khung trong vùng biến đổi trong chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, hoặc cả hai, của kháng thể được làm cho có tính chất giống người có thể chỉ bao gồm các gốc có nguồn gốc từ người, trong trường hợp này, vùng khung của kháng thể được làm cho có tính chất giống người được gọi là “vùng khung hoàn toàn của người” (*chẳng hạn*, MAb 2503). Theo một cách khác, một hoặc nhiều gốc của vùng khung của vùng biến đổi cho có thể được biến đổi trong các vị trí tương ứng của vùng khung của người của vùng biến đổi trong chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, hoặc cả hai, của kháng thể được làm cho có tính chất giống người nếu cần duy trì khả năng liên kết thích hợp hoặc gia tăng khả năng liên kết với kháng nguyên CD100. Do đó, vùng khung của người được biến đổi theo cách này sẽ bao gồm hỗn hợp các gốc vùng khung

của kháng thể cho và của người, và trong bản mô tả này sẽ được gọi là “vùng khung một phần của người.”

Chẳng hạn, quá trình làm cho có tính chất giống người kháng thể kháng CD100 có thể được thực hiện theo phương pháp của Winter và cộng sự (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)), bằng cách thay thế CDR hoặc trình tự CDR của gặm nhấm hoặc thể đột biến của các CDR này cho trình tự của kháng thể kháng CD100 của người. Tham khảo U.S. Pat. Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205. Kháng thể được làm cho có tính chất giống người kháng CD100 hình thành sẽ bao gồm ít nhất một CDR của gặm nhấm hoặc thể đột biến của nó trong vùng khung hoàn toàn của người của vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể được làm cho có tính chất giống người. Trong một số trường hợp, các gốc trong vùng khung của một hoặc nhiều vùng biến đổi của kháng thể được làm cho có tính chất giống người kháng CD100 được thay thế bằng các gốc tương ứng không phải của người (chẳng hạn, của gặm nhấm) (tham khảo, chẳng hạn, U.S. Pat. Nos. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; và 6,180,370), trong trường hợp này kháng thể được làm cho có tính chất giống người kháng CD100 hình thành sẽ bao gồm vùng khung một phần của người trong vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ.

Hơn nữa, kháng thể được làm cho có tính chất giống người có thể bao gồm các gốc không có trong kháng thể nhận hoặc kháng thể cho. Các biến đổi này được tạo ra để gia tăng hơn nữa hiệu năng của kháng thể (chẳng hạn, để đạt được ái lực mong muốn). Nói chung, kháng thể được làm cho có tính chất giống người sẽ bao gồm ít nhất một, và thường là hai, vùng biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các CDR tương ứng với CDR của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc gần như tất cả vùng khung là vùng khung của globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm cho có tính chất giống người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng cố định của globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng cố định của globulin miễn dịch của người. Chi tiết, tham khảo Jones *et al.*, *Nature* 331:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Do đó, kháng thể “được làm cho có tính chất giống người” có thể bao gồm kháng thể

trong đó một phần vùng biến đổi của người nguyên vẹn đã được thay thế bằng trình tự tương ứng của một loài không phải người. Trong thực nghiệm, kháng thể được làm cho có tính chất giống người thường là kháng thể người trong đó một số gốc trong CDR và có thể là một số gốc trong vùng khung được thay thế bằng các gốc ở vị trí tương ứng trong kháng thể của gặm nhấm. Tham khảo, chẳng hạn, U.S. Pat. No. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205. Tham khảo U.S. Pat. No. 6,180,370, và Công bố đơn quốc tế số WO 01/27160, trong đó kháng thể được làm cho có tính chất giống người và kỹ thuật để sản xuất kháng thể được làm cho có tính chất giống người có ái lực được cải thiện đối với kháng nguyên đã biết được đề cập.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được liên kết,” “được dung hợp,” hoặc “quá trình dung hợp” được sử dụng thay thế cho nhau. Các thuật ngữ này dùng để chỉ việc liên kết với nhau của hai yếu tố hoặc thành phần bằng một phương pháp bất kỳ bao gồm liên hợp hóa học hoặc tái tổ hợp. “Quá trình dung hợp trong khung” dùng để chỉ việc liên kết của hai hoặc nhiều hơn hai khung đọc mở polynucleotit (ORF) để tạo thành một ORF liên tục dài hơn, theo kiểu vẫn duy trì được khung đọc dịch mã chính xác của ORF gốc. Do đó, protein dung hợp tái tổ hợp là protein chứa hai hoặc nhiều hơn hai đoạn tương ứng với polypeptit được mã hóa bởi các ORF ban đầu (các đoạn thường không được liên hợp với nhau trong tự nhiên). Do đó, mặc dù khung đọc được tạo ra liên tục trong toàn bộ đoạn được dung hợp, nhưng các đoạn này có thể được phân tách về mặt vật lý hoặc về mặt không gian bằng, chẳng hạn, một trình tự liên kết trong khung. Chẳng hạn, polynucleotit mã hóa CDR của vùng biến đổi globulin miễn dịch có thể được dung hợp, trong khung, nhưng có thể được phân tách bằng polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng khung globulin miễn dịch hoặc các vùng CDR khác, miễn là CDR “được dung hợp” sẽ được đồng dịch mã như là một phần của polypeptit liên tục.

Trong trường hợp polypeptit, “trình tự thẳng” hoặc “trình tự” là một chuỗi axit amin trong một polypeptit theo hướng từ đầu amino đến carboxyl trong đó các gốc nằm cạnh nhau trong trình tự là liên tục trong cấu trúc bậc một của polypeptit.

Thuật ngữ “biểu hiện” Như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ quá trình trong đó gen sẽ tạo ra một sản phẩm hóa sinh, chẳng hạn, polypeptit. Quá trình này bao gồm quá trình biểu hiện một thể chức năng bất kỳ của gen trong tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình bất hoạt gen như cả quá trình biểu hiện tạm thời và biểu hiện ổn định. Quá trình này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phiên mã gen thành ARN thông tin (mARN), và dịch mã mARN thành polypeptit. Nếu sản phẩm mong muốn cuối cùng là một sản phẩm hóa sinh, thì quá trình biểu hiện bao gồm việc tạo ra sản phẩm hóa sinh và các tiền chất bất kỳ. Quá trình biểu hiện của gen sẽ tạo ra “sản phẩm của gen.” Như được sử dụng trong bản mô tả này, sản phẩm của gen có thể là axit nucleic, *chẳng hạn*, ARN thông tin được sản xuất bằng quá trình phiên mã gen, hoặc polypeptit được dịch mã từ bản sao phiên mã. Sản phẩm của gen như được đề cập trong bản mô tả này còn bao gồm axit nucleic có các biến đổi sau phiên mã, *chẳng hạn*, polyadenyl hóa, hoặc polypeptit có các biến đổi sau dịch mã, *chẳng hạn*, metyl hóa, glycosyl hóa, thêm lipit, kết hợp với các tiểu đơn vị protein khác, cắt protein, và các biến đổi tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị” hoặc “quá trình điều trị” dùng để chỉ cả quá trình điều trị và điều trị ngăn ngừa hoặc điều trị dự phòng, trong đó mục tiêu là ngăn ngừa hoặc làm chậm lại (giảm đi) thay đổi hoặc rối loạn sinh lý không mong muốn, như quá trình diễn tiến của xơ cứng rải rác, viêm khớp, hoặc ung thư. Kết quả lâm sàng mong muốn hoặc có lợi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm triệu chứng, giảm mức độ của bệnh, ổn định (*nghĩa là*, không làm nặng thêm) trạng thái của bệnh, giảm chậm quá trình diễn tiến của bệnh, làm giảm hoặc đơn giản hóa trạng thái của bệnh, và làm thuyên giảm (hoặc một phần hoặc toàn bộ), có thể phát hiện được hoặc không thể phát hiện được. “Quá trình điều trị” cũng có thể là kéo dài thời gian sống so với thời gian sống dự kiến nếu như không được điều trị. Những bệnh nhân cần điều trị bao gồm những bệnh nhân đã bị mắc bệnh hoặc rối loạn cũng như những bệnh nhân dễ bị mắc bệnh hoặc những bệnh nhân trong đó cần ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn này.

Thuật ngữ “đối tượng” hoặc “cá thể” hoặc “động vật” hoặc “bệnh nhân” hoặc “động vật có vú,” dùng để chỉ một đối tượng bất kỳ, đặc biệt là động vật có vú, trong

đó cần phải thực hiện quá trình chẩn đoán, tiên lượng hoặc điều trị. Động vật có vú bao gồm người, vật nuôi, gia súc, và động vật trong vườn thú, động vật thể thao, hoặc động vật cảnh như chó, mèo, chuột lang, thỏ, chuột, chuột nhắt, ngựa, trâu, bò, và các loại tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ như “đối tượng sẽ được hưởng lợi từ việc sử dụng kháng thể kháng CD100” và “động vật cần điều trị” bao gồm đối tượng, như động vật có vú, sẽ hưởng lợi từ việc sử dụng kháng thể kháng CD100, *chẳng hạn*, để phát hiện kháng polypeptit CD100 (*chẳng hạn*, trong chẩn đoán) và/hoặc từ quá trình điều trị, *nghĩa là*, giảm nhẹ hoặc ngăn ngừa bệnh, bằng kháng thể kháng CD100. Như được mô tả chi tiết hơn trong bản mô tả này, kháng thể kháng CD100 có thể được sử dụng ở dạng không liên hợp hoặc có thể được liên hợp, *chẳng hạn*, với dược chất, tiền dược chất, hoặc đồng vị.

II. Mô tả polypeptit đích

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “CD100” và “polypeptit CD100” được sử dụng thay thế cho nhau. Theo một số phương án, CD100 được biểu hiện trên bề mặt hoặc được tiết ra bởi tế bào. Theo một phương án khác, CD100 được gắn với màng tế bào. Theo một phương án khác, CD100 ở dạng hòa tan, *chẳng hạn*, CD100. Theo một phương án khác, CD100 có thể bao gồm CD100 nguyên vẹn hoặc mảnh của nó, hoặc biến thể polypeptit CD100, trong đó mảnh của CD100 hoặc biến thể polypeptit CD100 sẽ vẫn giữ được một vài hoặc tất cả hoạt tính của CD100 nguyên vẹn.

Protein CD100 nguyên vẹn của người là một protein chuyển màng đồng dime bao gồm hai chuỗi polypeptit có trọng lượng 150kDa. CD100 thuộc họ semaphorin của thụ thể bề mặt tế bào và cũng được gọi là SEMA4D. Cả sema4D/CD100 của người và chuột đều được cắt bằng proteaza từ dạng chuyển màng để tạo thành dạng hòa tan có trọng lượng phân tử 120kDa, chỉ ra sự tổng tại của hai dạng Sema4D (Kumanogoh *et al.*, *J. Cell Science* 116(7):3464 (2003)). Semaphorin bao gồm các protein tan và protein gắn màng ban đầu được xác định là các yếu tố dẫn truyền axon đóng vai trò quan trọng trong việc thiết lập sự liên hệ chính xác giữa neuron và đích

thích hợp của nơron. Có cấu trúc được coi là semaphorin lớp IV, CD100 bao gồm trình tự tín hiệu đầu cùng amino sau đó là một vùng 'Sema' đặc trưng, bao gồm 17 gốc xystein được bảo toàn, một vùng chức năng giống như Ig, vùng kéo căng giàu lyzin, vùng chuyển màng kỵ nước, và phần đuôi nằm trong tế bào chất.

Mỗi chuỗi polypeptit của CD100 bao gồm trình tự tín hiệu khoảng 13 axit amin sau đó là vùng semaphorin khoảng 512 axit amin, vùng giống globulin miễn dịch (giống Ig) khoảng 65 axit amin, vùng kéo căng giàu lyzin 104 axit amin, vùng chuyển màng kỵ nước khoảng 19 axit amin, và phần đuôi nằm trong tế bào chất 110 axit amin. Một vị trí liên ứng để phosphoryl hóa tyrosin trong phần đuôi nằm trong tế bào chất sẽ hỗ trợ quá trình liên kết được dự đoán của CD100 với tyrosin kinaza (Schlossman, et al., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

Hai loại thụ thể đã được xác định đối với CD100. Một trong số đó là Plexin-B1, được biểu hiện trong mô không bạch huyết và đã được chỉ ra là một thụ thể có ái lực cao (1nM) đối với CD100 (Tamagnone *et al.*, *Cell* 99:71-80 (1999)). Quá trình kích thích CD100 của con đường truyền tín hiệu qua Plexin B1 đã được chỉ ra là kích thích quá trình suy giảm đỉnh sinh trưởng của nơron, và kích thích quá trình suy giảm toàn diện và quá trình chết theo chương trình của tế bào thần kinh đệm ít gai (Giraudon *et al.*, *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon *et al.*, *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). Sau khi gắn với CD100, tín hiệu Plexin B1 sẽ kích thích quá trình bất hoạt R-Ras, dẫn đến sự giảm quá trình liên kết qua trung gian integrin với chất nền ngoại bào, cũng như với quá trình hoạt hóa Rho, dẫn đến sự suy giảm tế bào do quá trình sắp xếp lại bộ khung tế bào. Tham khảo Kruger *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15:61-64 (2005)).

Trong các mô bạch huyết, CD72 được sử dụng là thụ thể có ái lực thấp (300nM) đối với CD100 (Kumanogoh *et al.*, *Immunity* 13:621-631 (2000)). Tế bào B và APC biểu hiện CD72, và kháng thể kháng CD72 có rất nhiều tác dụng tương tự như CD100, như gia tăng đáp ứng tế bào B được kích hoạt bởi CD40 và quá trình sản xuất CD23 của tế bào B. CD72 được cho là hoạt động như một yếu tố điều hòa âm tính của đáp ứng tế bào B bằng cách sử dụng tyrosin phosphatase SHP-1, có thể liên hợp với

nhieu thụ thể ức chế. Quá trình tương tác của CD100 với CD72 dẫn đến sự phân ly của SHP-1, và sự mất tin hiệu hoạt hóa âm tính. CD100 đã được chỉ ra là kích thích quá trình kích thích tế bào T và kết tụ và sống sót của tế bào B *in vitro*. Việc thêm tế bào biểu hiện CD100 hoặc CD100 sẽ làm gia tăng quá trình tăng sinh tế bào B được kích thích bởi CD40 và quá trình sản xuất globulin miễn dịch *in vitro*, và gia tăng đáp ứng kháng thể *in vivo* (Ishida *et al.*, *Inter. Immunol.* 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh và H. Kukutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). CD100 gia tăng quá trình trưởng thành của DC được kích thích bởi CD40, bao gồm điều hòa tăng các phân tử đồng kích thích và gia tăng quá trình tiết IL-12. Ngoài ra, CD100 có thể ức chế quá trình di cư của tế bào miễn dịch, quá trình này có thể được đảo ngược bằng cách thêm kháng thể kháng CD100 của chuột (Elhabazi *et al.*, *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire *et al.*, *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

Sema4D được biểu hiện ở mức độ cao trong các cơ quan bạch huyết, bao gồm lách, tuyến ức, và hạch bạch huyết, và trong các cơ quan không bạch huyết, như não, tim, và thận. Trong các cơ quan bạch huyết, Sema4D được biểu hiện nhiều trên tế bào T nghỉ nhưng được biểu hiện yếu trên tế bào B nghỉ và tế bào trình diện kháng nguyên (APC), như tế bào tua (DC).

Quá trình hoạt hóa tế bào sẽ gia tăng quá trình biểu hiện trên bề mặt của CD100 cũng như quá trình tạo ra CD100 hòa tan (CD100). Kiểu biểu hiện của CD100 chỉ ra rằng chúng đóng vai trò sinh lý cũng như bệnh học quan trọng trong hệ miễn dịch. CD100 đã được chỉ ra là kích thích quá trình hoạt hóa, kết tụ và sống sót của tế bào B; gia tăng quá trình tăng sinh và sản xuất kháng thể được kích thích bởi CD40; gia tăng đáp ứng kháng thể với kháng nguyên phụ thuộc tế bào T; gia tăng quá trình tăng sinh tế bào T; gia tăng quá trình trưởng thành tế bào tua và có khả năng kích thích tế bào T; và có liên quan trực tiếp trong quá trình khử myelin hóa và quá trình thoái hóa axon (Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); và Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167:4321-4328 (2001)).

Chuột không có CD100 (CD100^{-/-}) đã tạo ra các bằng chứng rằng CD100 đóng vai trò quan trọng trong cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch tế bào.

Không có một bất thường đã biết nào trong mô không bạch huyết của chuột CD100^{-/-}. Tế bào tua (DC) của chuột CD100^{-/-} có khả năng dị kích thích kém và biểu hiện các tổn thương trong quá trình biểu hiện các phân tử đồng kích thích, có thể được khôi phục bằng cách thêm CD100. Chuột bị thiếu CD100 (CD100^{-/-}) không có khả năng phát triển bệnh viêm não tủy tự miễn trong thử nghiệm được kích thích bằng glycoprotein peptit myelin của tế bào thần kinh đệm ít gai, vì tế bào T đặc hiệu với glycoprotein myelin tế bào thần kinh đệm ít gai không được tạo ra khi không có CD100 (Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169:1175-1181 (2002)). Một lượng đáng kể CD100 hòa tan cũng được phát hiện trong huyết thanh của chuột MRL/lpr dễ bị mắc bệnh tự miễn (mẫu động vật bệnh tự miễn toàn thân như SLE), nhưng không có trong chuột bình thường. Hơn nữa, nồng độ của CD100 có tương quan với nồng độ của tự kháng thể và gia tăng theo độ tuổi (Wang *et al.*, *Blood* 97:3498-3504 (2001)). CD100 hòa tan cũng được chỉ ra là tích tụ trong dịch não tủy và huyết thanh của bệnh nhân bị bệnh khử myelin hóa, và CD100 kích thích quá trình chết theo chương trình của tiền tế bào thần kinh đa tiềm năng của người (tế bào Dev), và còn ức chế sự mở rộng của quá trình này và kíchthichs quá trình chết theo chương trình của tế bào thần kinh đệm ít gai của chuột *in vitro* (Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004)). Quá trình chết theo chương trình được chặn bởi MAb kháng CD100.

III. Kháng thể kháng CD100

Kháng thể liên kết với CD100 đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, chẳng hạn, US Publ. No. 2008/0219971 A1, Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền quốc tế WO 93/14125 và Herold *et al.*, *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995).

Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD100 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó liên kết với CD100, chẳng hạn, MAb 2503, MAb 67, và MAb 76. Theo một số phương án kháng thể kháng CD100 liên kết với CD100 của người, của chuột hoặc của người và chuột. Theo các phương án khác, kháng thể kháng CD100 chặn quá trình liên kết của CD100 với thụ thể của nó, chẳng hạn, Plexin-B.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết được phân lập, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với epitop CD100 tương tự như kháng thể đơn dòng 2503, 67, hoặc 76. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết được phân lập, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với CD100, và ức chế cạnh tranh với kháng thể đơn dòng 2503, 67, hoặc 76 trong quá trình liên kết đặc hiệu với CD100, *chẳng hạn*, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột.

Theo một số phương án, phân tử liên kết theo sáng chế có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất about 80%, khoảng 85%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, hoặc khoảng 95% so với trình tự axit amin của kháng thể kháng CD100 đối chứng. Theo một phương án khác, phân tử liên kết có độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc 100% so với kháng thể đối chứng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (vùng VH), trong đó ít nhất một trong số các CDR của vùng VH có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với CDR1, CDR2 hoặc CDR3 của SEQ ID NO: 9 hoặc 10.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (vùng VH), trong đó ít nhất một CDR của vùng VH có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm an vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (vùng VH), trong đó ít nhất một CDR của vùng VH

có trình tự axit amin giống, trừ 1, 2, 3, 4, hoặc 5 đột biến thay thế axit amin bảo toàn, với SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng VH có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể kháng CD100 bao gồm vùng VH được mã hóa liên kết đặc hiệu hoặc liên kết ưu tiên với CD100.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (vùng VL), trong đó ít nhất một CDR của vùng VL có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với CDR1, CDR2 hoặc CDR3 of SEQ ID NO: 17 hoặc 18.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (vùng VL), trong đó ít nhất một CDR của vùng VL có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, hoặc SEQ ID NO: 16.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (vùng VL), trong đó ít nhất một CDR của vùng VL có trình tự axit amin giống, trừ 1, 2, 3, 4, hoặc 5 đột biến thay thế axit amin bảo toàn, với SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, hoặc SEQ ID NO: 16.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng VL có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%,

khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 18, trong đó kháng thể kháng CD100 bao gồm vùng VL được mã hóa liên kết đặc hiệu hoặc liên kết ưu tiên với CD100.

Các biến thể có hoạt tính sinh học thích hợp của kháng thể kháng CD100 theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Các biến thể này sẽ duy trì hoạt tính liên kết mong muốn của kháng thể kháng CD100 gốc. Phương pháp tạo ra các biến thể kháng thể này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp gây đột biến và biến đổi trình tự nucleotit đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tham khảo, chẳng hạn, Walker và Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); U.S. Pat. No. 4,873,192; và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong đó. Hướng dẫn để gây đột biến thay thế axit amin thích hợp không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của polypeptit cần quan tâm có thể được tìm thấy trong mô hình của Dayhoff *et al.* (1978) trong *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352. Mô hình của Dayhoff *et al.* sử dụng ma trận tương đồng axit amin đột biến điểm (PAM) (ma trận PAM 250) để xác định các đột biến thay thế axit amin bảo toàn thích hợp. Các thay thế bảo toàn, như chuyển đổi một axit amin thành một axit amin khác có hoạt tính tương tự, có thể được ưu tiên. Ví dụ về đột biến thay thế axit amin bảo toàn như được giải thích trong ma trận PAM 250 của mô hình Dayhoff *et al.* bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, và Phe↔Trp↔Tyr.

Trong quá trình thiết kế biến thể của phân tử liên kết kháng CD100, chẳng hạn, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, polypeptit cần quan tâm, các biến đổi sẽ được tạo ra sao cho biến thể vẫn có hoạt tính mong muốn, chẳng hạn, có khả năng liên kết đặc hiệu với CD100, chẳng hạn, CD 100 của người, của chuột hoặc của người và chuột, chẳng hạn, được biểu hiện trên bề mặt của hoặc được tiết bởi tế bào và

có hoạt tính chặn CD100, như được đề cập trong bản mô tả này. Hiển nhiên, một đột biến bất kỳ được tạo ra trong ADN mã hóa biến thể polypeptit không thể thay thế trình tự ngoài khung đọc và tốt hơn là không tạo ra vùng bổ sung có thể tạo ra một cấu trúc mARN thứ hai. Tham khảo Công bố đơn yêu cầu cấp bằng châu Âu số 75,444.

Phương pháp đo độ đặc hiệu liên kết của phân tử liên kết kháng CD100, chẳng hạn, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm liên kết cạnh tranh tiêu chuẩn, thử nghiệm theo dõi quá trình tiết globulin miễn dịch bởi tế bào T hoặc tế bào B, thử nghiệm tăng sinh tế bào T, thử nghiệm quá trình chết theo chương trình, thử nghiệm ELISA, và các thử nghiệm tương tự. Tham khảo, chẳng hạn, các thử nghiệm được đề cập trong WO 93/14125; Shi *et al.*, *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh *et al.*, *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe *et al.*, *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang *et al.*, *Blood* 97:3498-3504 (2001); và Giraudon *et al.*, *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004).

Khi được thảo luận trong bản mô tả này liệu một polypeptit cụ thể bất kỳ, bao gồm vùng cố định, CDR, vùng VH, hoặc vùng VL được đề cập trong bản mô tả này, có độ tương đồng ít nhất khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc thậm chí là khoảng 100% với một polypeptit, thì % tương đồng có thể được đánh giá bằng các phương pháp và chương trình/phần mềm máy tính đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chương trình BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) hay không. BESTFIT sử dụng thuật toán độ tương đồng tại chỗ của Smith và Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489, để tìm ra đoạn có độ tương đồng lớn nhất giữa hai trình tự. Khi sử dụng BESTFIT hoặc một chương trình xếp thẳng trình tự bất kỳ khác để đánh giá liệu một trình tự cụ thể, chẳng hạn, có độ tương đồng 95% với một trình tự đối chứng theo sáng chế hay không, các tham số sẽ được cài đặt, tất nhiên là sao cho tỷ lệ phần trăm độ tương đồng sẽ được tính trên toàn bộ trình tự polypeptit đối chứng và

các lỗ hổng trong độ tương đồng không vượt quá 5% tổng số axit amin trong trình tự đối chứng.

Theo mục tiêu của sáng chế, tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự có thể được xác định sử dụng thuật toán tìm kiếm độ tương đồng Smith-Waterman sử dụng tìm kiếm lỗ hổng affin với độ mở đoạn trống là 12 và mức độ mở rộng đoạn trống là 2, BLOSUM matrix là 62. Thuật toán tìm kiếm độ tương đồng Smith-Waterman được giải thích trong tài liệu Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Chẳng hạn, biến thể có thể khác với kháng thể kháng CD100 đối chứng (*chẳng hạn*, MAb 2503, 67 hoặc 76) khoảng 1 đến 15 axit amin, 1 đến 10 axit amin, như 6 đến 10, 5, 4, 3, 2, hoặc thậm chí là 1 gốc axit amin.

Cấu trúc hóa học chính xác của polypeptit có khả năng liên kết đặc hiệu với CD100 và duy trì được hoạt tính chặn CD100 mong muốn phụ thuộc vào một số yếu tố. Như nhóm amino và carboxyl có khả năng ion hóa có trong phân tử, một polypeptit cụ thể có thể thu được từ ở dạng muối axit hoặc muối bazơ, hoặc ở dạng trung hòa. Tất cả các dạng bào chế này vẫn giữ được hoạt tính sinh học khi được cho vào một môi trường thích hợp có trong định nghĩa của kháng thể kháng CD100 Như được sử dụng trong bản mô tả này. Hơn nữa, trình tự axit amin sơ cấp của polypeptit có thể được gia tăng bằng cách tạo dẫn xuất sử dụng các gốc đường (glycosyl hóa) hoặc bằng các phân tử bổ trợ khác như lipid, phosphat, nhóm axetyl và các nhóm tương tự. Nó cũng có thể được gia tăng bằng cách liên hợp với saccharit. Một số khía cạnh của phương pháp gia tăng này được thực hiện thông qua các hệ thống xử lý sau dịch mã của vật chủ; các biến đổi khác có thể được đưa vào *in vitro*. Trong bất kỳ một khía cạnh nào, các biến đổi này được bao gồm trong định nghĩa của kháng thể kháng CD100 được sử dụng trong bản mô tả này miễn là hoạt tính mong muốn của kháng thể kháng CD100 không bị phá hủy. Có thể kỳ vọng rằng các biến đổi này sẽ ảnh hưởng một cách định tính hoặc định lượng đến hoạt tính, bằng cách gia tăng hoặc loại bỏ hoạt tính của polypeptit, trong các thử nghiệm khác nhau. Hơn nữa, từng gốc axit amin cụ thể trong chuỗi có thể được biến đổi bằng phương pháp oxi hóa, khử, hoặc các phương pháp tạo dẫn xuất khác, và polypeptit có thể được phân cắt để tạo ra mảnh vẫn duy trì được hoạt tính. Các biến đổi này không phá hủy hoạt tính mong muốn (*chẳng hạn*, độ đặc hiệu

liên kết đối với CD100, ái lực liên kết, và hoạt tính chặn CD100) không loại bỏ trình tự polypeptit ra khỏi định nghĩa của kháng thể kháng CD100 cần quan tâm. Như được sử dụng trong bản mô tả này.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã có một số hướng dẫn cơ bản liên quan đến việc tạo ra và sử dụng biến thể polypeptit. Trong quá trình tạo ra phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, biến thể, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định một cách dễ dàng các biến đổi nào cần được thực hiện với trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin của protein gốc sẽ tạo ra biến thể thích hợp để sử dụng là một hoạt chất điều trị trong được phẩm được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Vùng cố định của kháng thể kháng CD100 có thể được gây đột biến để biến đổi chức năng hiệu ứng theo một số cách khác nhau. Chẳng hạn, tham khảo U.S. Pat. No. 6,737,056B1 và U.S. Patent Application Publication No. 2004/0132101A1, đề cập đến quá trình gây đột biến Fc có khả năng tối ưu mức độ liên kết của kháng thể với thụ thể Fc.

Trong một số kháng thể kháng CD100, phần Fc có thể được gây đột biến để giảm chức năng hiệu ứng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, loại bỏ hoặc bất hoạt (thông qua phương pháp gây đột biến điểm hoặc các phương pháp khác) vùng cố định có thể làm giảm khả năng liên kết với thụ thể Fc của kháng thể được biến đổi trong hệ tuần hoàn nhờ do gia tăng mức độ khu trú của kháng thể trong khối u. trong các trường hợp khác, có thể biến đổi vùng cố định phù hợp để biến đổi khả năng liên kết với bổ thể và do đó có thể giảm thời gian bán hủy trong huyết tương và các liên kết không đặc hiệu của các độ tổ tế bào được liên hợp. Các biến đổi vùng cố định khác cũng có thể được sử dụng để biến đổi liên kết disulfit hoặc các gốc oligosaccarit cho phép gia tăng mức độ khu trú do gia tăng độ đặc hiệu với kháng nguyên hoặc mức độ linh hoạt của kháng thể. Hoạt tính sinh lý, sinh khả dụng và các tác dụng hóa sinh khác của biến thể, như khả năng khu trú trong khối u, khả năng phân bố sinh học và thời gian bán hủy trong huyết tương, có thể dễ dàng

được đo và định lượng sử dụng các kỹ thuật miễn dịch đã biết mà không cần một quá trình thử nghiệm không cần thiết nào.

Kháng thể kháng CD100 theo sáng chế cũng bao gồm dẫn xuất được biến đổi, *chẳng hạn*, bằng cách liên kết đồng hóa trị một loại phân tử bất kỳ với kháng thể sao cho quá trình liên kết đồng hóa trị không ngăn kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop cùng họ của nó. Chẳng hạn, một cách không hạn chế, dẫn xuất kháng thể bao gồm kháng thể đã được biến đổi, *chẳng hạn*, bằng cách glycosyl hóa, axetyl hóa, peg hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/nhóm phong bế đã biết, cắt phân giải protein, liên kết với một phối tử ngoại bào hoặc các protein khác, v.v.. Một trong số rất nhiều phương pháp biến đổi hóa học có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn phân cắt hóa học đặc hiệu, axetyl hóa, formyl hóa, v.v.. Ngoài ra, dẫn xuất có thể chứa một hoặc nhiều axit amin không cổ điển.

Một “thay thế axit amin bảo toàn” là một thay thế axit amin trong đó gốc axit amin sẽ được thay thế bằng một gốc axit amin có chuỗi bên có điện tích tương tự. Các họ gốc axit amin có chuỗi bên có điện tích tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này bao gồm axit amin có chuỗi bên có tính bazơ (*chẳng hạn*, lyzin, arginin, histidin), chuỗi bên có tính axit (*chẳng hạn*, axit aspartic, axit glutamic), chuỗi bên phân cực không tích điện (*chẳng hạn*, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), chuỗi bên không phân cực (*chẳng hạn*, alanin, valin, loxin, isoloxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan), chuỗi bên phân nhánh beta (*chẳng hạn*, threonin, valin, isoloxin) và chuỗi bên thơm (*chẳng hạn*, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Theo một cách khác, đột biến có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên dọc theo một phần hoặc toàn bộ trình tự mã hóa, như bằng phương pháp gây đột biến bão hòa, và thể đột biến hình thành có thể được sàng lọc hoạt tính sinh học để xác định thể đột biến vẫn giữ được hoạt tính (*chẳng hạn*, khả năng liên kết với kháng polypeptit CD100).

Chẳng hạn, có thể chỉ đưa đột biến vào vùng khung hoặc vùng CDR của phân tử kháng thể. Đột biến được đưa vào có thể là đột biến không có tác dụng hoặc neutral

missense đột biến, *nghĩa là*, không có, hoặc có rất ít tác dụng lên khả năng liên kết với kháng nguyên của kháng thể. Các loại đột biến này có thể là hữu dụng để tối ưu việc sử dụng mã bộ ba, hoặc tăng cường khả năng sản xuất kháng thể của tế bào lai. Theo một cách khác, các non-neutral missense đột biến có thể biến đổi khả năng liên kết với kháng nguyên của kháng thể. Vị trí của hầu hết các đột biến không có tác dụng và đột biến missense trung tính có khả năng nằm trong vùng khung, trong khi vị trí của hầu hết các non-neutral missense đột biến có khả năng nằm trong CDR, mặc dù điều này không phải là một yêu cầu tuyệt đối. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có khả năng thiết kế và thử nghiệm phân tử đột biến có hoạt tính mong muốn như không biến đổi hoạt tính liên kết kháng nguyên hoặc thay đổi hoạt tính liên kết (chẳng hạn, cải thiện hoạt tính liên kết với kháng nguyên hoặc thay đổi độ đặc hiệu kháng thể). Sau khi gây đột biến, protein được mã hóa có thể được biểu hiện thường xuyên và có hoạt tính sinh học và/hoặc chức năng của protein được mã hóa, (*chẳng hạn*, khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với ít nhất một epitop của polypeptit CD100) có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật được đề cập trong bản mô tả này hoặc bằng các kỹ thuật biến đổi thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD100 theo sáng chế bao gồm ít nhất một vùng quyết định bổ thể được tối ưu (CDR). Thuật ngữ “CDR được tối ưu” được dùng để chỉ CDR đã được biến đổi và trình tự tối ưu được chọn dựa trên ái lực liên kết và/hoặc hoạt tính kháng CD100 được bảo toàn hoặc được gia tăng sẽ được chuyển cho kháng thể kháng CD100 bao gồm CDR được tối ưu. “Hoạt tính kháng CD100” hoặc “hoạt tính chặn CD100” có thể bao gồm hoạt tính điều biến một hoặc nhiều các hoạt tính sau liên quan đến CD100: quá trình hoạt hóa, kết tụ và sống sót tế bào B; quá trình tăng sinh và quá trình sản xuất kháng thể được kích thích bởi CD40; đáp ứng kháng thể với kháng nguyên phụ thuộc tế bào T; quá trình tăng sinh tế bào T hoặc các tế bào miễn dịch khác; quá trình trưởng thành tế bào tua; quá trình khử myelin hóa và quá trình thoái hóa axon; quá trình chết theo chương trình tiền tế bào thần kinh và/hoặc tế bào thần kinh đệm ít gai đa tiềm năng; kích thích sự di cư của tế bào nội bì; ức chế quá trình di cư tự phát của tế bào đơn nhân; liên kết với plexin B1 bề mặt tế bào; hoặc các hoạt tính bất kỳ đi kèm với CD100 hòa tan hoặc CD100 được biểu hiện trên bề mặt

của tế bào CD100+. Hoạt tính kháng CD100 cũng có thể được quy cho sự giảm tỷ lệ mắc bệnh hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh liên quan đến quá trình biểu hiện CD100, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một số loại u lympho, bệnh tự miễn, bệnh viêm bao gồm hệ thần kinh trung ương (CNS) và bệnh viêm hệ thần kinh ngoại biên (PNS), thải ghép, và tạo mạch xâm nhập. Ví dụ về kháng thể được tối ưu dựa trên MAb kháng CD100 BD16 và BB18 của chuột, được mô tả trong US Publ. No. 2008/0219971 A1, Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền quốc tế WO 93/14125 và Herold *et al.*, *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995). Các biến đổi có thể bao gồm việc thay thế các gốc axit amin trong CDR sao cho kháng thể kháng CD100 vẫn giữ được độ đặc hiệu đối với kháng nguyên CD100 và có ái lực liên kết được cải thiện và/hoặc hoạt tính kháng CD100 được cải thiện.

IV. Polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD100

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (vùng VH), trong đó ít nhất một CDR của vùng VH có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với trình tự polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 5.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng VH globulin miễn dịch, trong đó ít nhất một CDR của vùng VH được chọn từ nhóm bao gồm: (a) CDR1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng VH có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với trình tự polypeptit vùng VH đối chứng bao gồm SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể kháng CD100 bao gồm vùng VH được mã hóa liên kết đặc hiệu hoặc liên kết ưu tiên với CD100.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (vùng VL), trong đó ít nhất một CDR của vùng VL có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với trình tự polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, và SEQ ID NO: 13.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa globulin miễn dịch vùng VL, trong đó ít nhất một CDR của vùng VL được chọn từ nhóm bao gồm: (a) CDR1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 14; (b) CDR2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 15; và (c) CDR3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trên SEQ ID NO: 16.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng VL có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc giống với trình tự polypeptit vùng VL đối chứng bao gồm SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 18, trong đó kháng thể kháng CD100 bao gồm vùng VL được mã hóa liên kết đặc hiệu hoặc liên kết ưu tiên với CD100.

Một polypeptit bất kỳ nêu trên còn bao có thể bao gồm axit nucleic bổ trợ, mã hóa, *chẳng hạn*, peptit tín hiệu để điều khiển quá trình thiết của polypeptit được mã

hóa, vùng cố định của kháng thể như được đề cập trong bản mô tả này, hoặc các polypeptit khác loại như được đề cập trong bản mô tả này. Tương tự, như được mô tả chi tiết ở đây, sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm một hoặc nhiều polypeptit nêu trên.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai trong đó polynucleotit thứ nhất mã hóa vùng VH như được đề cập trong bản mô tả này và trong đó polynucleotit thứ hai mã hóa vùng VL như được đề cập trong bản mô tả này. Cụ thể, được phẩm chứa, bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm vùng VH-polynucleotit mã hóa, như được thể hiện trên SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20, và vùng VL-polynucleotit mã hóa, chẳng hạn, polynucleotit mã hóa vùng VL như được thể hiện trên SEQ ID NO: 21 hoặc SEQ ID NO: 22.

Sáng chế cũng đề cập đến mảnh polypeptit theo sáng chế, như được mô tả theo sáng chế. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa polypeptit dung hợp, mảnh Fab, và các r dẫn xuất khác, như được đề cập trong bản mô tả này, cũng được đề cập theo sáng chế.

Polypeptit có thể được sản xuất bởi một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, nếu trình tự nucleotit của kháng thể là đã biết, polynucleotit mã hóa kháng thể có thể được tổng hợp từ các oligonucleotit được tổng hợp hóa học (*chẳng hạn*, như được đề cập trong Kutmeier *et al.*, *Bio Techniques* 17:242 (1994)), theo đó, phương pháp bày bao gồm việc tổng hợp các oligonucleotit gói đầu nhau chứa các phần khác nhau của trình tự mã hóa kháng thể, ủ và gắn các oligonucleotit với nhau, và sau đó khuếch đại oligonucleotit vừa tạo thành bằng PCR.

Theo một cách khác, polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, có thể được tạo ra từ axit nucleic từ một nguồn thích hợp. Nếu thể tách dòng chứa axit nucleic mã hóa một kháng thể cụ thể là không khả dụng, nhưng trình tự của phân tử kháng thể là đã biết, axit nucleic mã hóa kháng thể có thể được tổng hợp hóa học hoặc thu được từ một nguồn thích hợp (*chẳng hạn*, ngân hàng ADN bổ trợ kháng thể, hoặc ngân hàng ADN bổ trợ được tạo ra từ, hoặc axit nucleic, thường là poly A+ARN, được phân lập từ, một mô hoặc tế bào bất kỳ biểu hiện kháng thể hoặc kháng thể kháng CD100 khác, như tế

bào lai được chọn để biểu hiện kháng thể) bằng cách khuếch đại PCR sử dụng môi tổng hợp có khả năng lai với đầu 3' và 5' của trình tự hoặc bằng phương pháp tách dòng sử dụng đoạn dò oligonucleotit đặc hiệu đối với một trình tự gen cụ thể để xác định, *chẳng hạn*, thể tách dòng ADN bổ trợ từ ngân hàng ADN bổ trợ mã hóa kháng thể hoặc các kháng thể kháng CD100 khác. Axit nucleic được khuếch đại được tạo bởi PCR sau đó có thể được tách dòng vào vector tách dòng có khả năng tự sao sử dụng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi trình tự nucleotit và trình tự axit amin của kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được xác định, trình tự nucleotit của nó thể được biến đổi bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để biến đổi trình tự nucleotit, *chẳng hạn*, kỹ thuật ADN tái tổ hợp, tạo đột biến đặc hiệu vị trí, PCR, v.v.. (tham khảo, *chẳng hạn*, kỹ thuật được đề cập trong Sambrook et al. (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) và Ausubel et al., eds. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY)), để tạo ra kháng thể có trình tự axit amin khác, *chẳng hạn* để tạo đột biến thay thế, loại bỏ và/hoặc thêm axit amin.

Polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được tạo bởi polyribonucleotit hoặc polydeoxyribonucleotit, có thể là ARN hoặc ADN không được biến đổi hoặc ARN hoặc ADN được biến đổi. *Chẳng hạn*, polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể được tạo bởi ADN sợi đơn hoặc sợi kép, ADN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, ARN sợi đơn hoặc sợi kép, và ARN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, phân tử lai bao gồm ADN và ARN có thể là sợi đơn hoặc sợi kép hoặc hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép. Ngoài ra, polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể được tạo bởi vùng sợi ba bao gồm ARN hoặc ADN hoặc both ARN và ADN. Polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, cũng có thể chứa

một hoặc nhiều bazơ bị biến đổi hoặc bộ khung ADN hoặc ARN được biến đổi do tính ổn định hoặc vì các lý do khác. Bazơ “được biến đổi” bases bao gồm, chẳng hạn, bazơ được trityl hóa và bazơ không phổ biến như inosin. Một loạt các biến đổi khác cũng có thể được tạo ra với ADN và ARN; do đó, “polynucleotit” bao gồm cả dạng được biến đổi về mặt hóa học, hoạt tính enzym hoặc chuyển hóa.

Polynucleotit được phân lập mã hóa biến thể không tự nhiên của polypeptit thu được từ globulin miễn dịch (*chẳng hạn*, phần chuỗi nặng hoặc phần chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch) có thể được tạo ra bằng cách đưa vào một hoặc nhiều thay thế, thêm hoặc bớt nucleotit vào trình tự nucleotit của globulin miễn dịch sao cho một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm hoặc bớt axit amin được đưa vào protein được mã hóa. Đột biến có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, như đột biến điểm và Đột biến bằng PCR. Tốt hơn, nếu đột biến thay thế axit amin bảo toàn được tạo ra ở một hoặc nhiều vị trí axit amin không thiết yếu.

V. Protein dung hợp và thể liên hợp kháng thể

Như được bàn luận chi tiết hơn trong bản mô tả này, Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, còn có thể được dung hợp tái tổ hợp với polypeptit khác ở đầu N- hoặc C hoặc được liên hợp hóa học (bao gồm liên hợp đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị) với polypeptit hoặc các thành phần khác. Chẳng hạn, kháng thể kháng CD100 có thể được dung hợp tái tổ hợp hoặc liên hợp với phân tử hữu dụng làm chất đánh dấu trong thử nghiệm phát hiện và phân tử hiệu ứng như polypeptit khác loại, dược chất, nuclit phóng xạ, hoặc độc tố. Tham khảo, *chẳng hạn*, Công bố PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patent Mỹ số 5,314,995; và EP 396,387.

Kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, may bao gồm dẫn xuất được biến đổi, *nghĩa là*, bằng cách liên kết đồng hóa trị với một loại phân tử bất kỳ sao cho liên kết đồng hóa trị không ngăn ngừa quá trình liên kết của kháng thể kháng CD100. Chẳng hạn, theo cách không hạn chế, dẫn xuất kháng thể bao gồm kháng thể đã được biến đổi, *chẳng hạn*, bằng cách glycosyl hóa, axetyl hóa, peg hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, tạo dẫn xuất bằng

một nhóm bảo vệ/nhóm phong bế đã biết, cắt phân giải protein, liên kết với phối tử tế bào hoặc các protein khác, v.v.. Bất kỳ một biến đổi nào trong số rất nhiều phương pháp biến đổi có thể được tiến hành bằng một kỹ thuật đã biết bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phân cắt hóa học đặc hiệu, axetyl hóa, formyl hóa, v.v.. Ngoài ra, dẫn xuất có thể chứa một hoặc nhiều axit amin không tự nhiên.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được tạo bởi axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit hoặc liên kết peptit được biến đổi, *nghĩa là*, đẳng vị peptit, và có thể chứa axit amin khác 20 axit amin được mã hóa bởi gen. Chẳng hạn, kháng thể kháng CD100 có thể được biến đổi bằng các quy trình tự nhiên, như biến đổi sau dịch mã, hoặc bằng kỹ thuật biến đổi hóa học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các biến đổi này đã được đề cập trong phần mô tả và cụ thể hơn trong phần mô tả nêu trên, cũng như trong lĩnh vực kỹ thuật này. Biến đổi có thể xảy ra tại một vị trí bất kỳ trong phân tử liên kết kháng CD100, bao gồm bộ khung peptit, chuỗi bên của axit amin và đầu amino hoặc carboxyl, hoặc trên các gốc như carbohydrat. Có thể hiểu rằng cùng một loại biến đổi có thể có ở mức độ giống hoặc khác nhau tại một vài vị trí trong phân tử liên kết kháng CD100 nhất định. Tương tự, một phân tử liên kết kháng CD100 nhất định có thể chứa nhiều loại biến đổi. Phân tử liên kết kháng CD100 có thể được phân nhánh, chẳng hạn, do quá trình ubiquitin hóa, và có thể ở dạng vòng, có hoặc không phân nhánh. Phân tử liên kết kháng CD100 mạch nhánh, mạch vòng, hoặc mạch vòng phân nhánh có thể tạo ra từ quá trình biến đổi tự nhiên sau dịch mã hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp. Biến đổi bao gồm axetyl hóa, axyl hóa, ADP-ribosyl hóa, amit hóa, liên kết đồng hóa trị flavin, liên kết đồng hóa trị với gốc heme, liên kết đồng hóa trị nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, liên kết đồng hóa trị lipid hoặc dẫn xuất lipid, liên kết đồng hóa trị phosphatidylinositol, vòng hóa liên kết chéo, vòng hóa, tạo liên kết disulfit, khử metyl hóa, tạo liên kết chéo đồng hóa trị, tạo thành xystein, tạo pyroglutamat, formyl hóa, gamma-carboxyl hóa, glycosyl hóa, tạo nhóm GPI, hydroxyl hóa, iot hóa, metyl hóa, myristoyl hóa, oxi hóa, peg hóa, xử lý phân cắt protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, racemic hóa, selen hóa, sulfat hóa, thêm axit amin vào protein qua trung gian ARN vận chuyển như arginyl hóa, và ubiquitin hóa. (Tham

khảo, chẳng hạn, Protein--Structure và Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman và Company, NY; 2nd ed. (1993); Johnson, ed. (1983) Posttranslational Covalent Modification of Protein (Academic Press, NY), pgs. 1-12; Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)).

Sáng chế cũng đề cập đến protein dung hợp bao gồm kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, và polypeptit khác loại. Polypeptit khác loại dung hợp với kháng thể có thể là hữu dụng đối với chức năng hoặc hữu dụng để hướng tế bào biểu hiện kháng polypeptit CD100.

Theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc gồm, polypeptit có trình tự axit amin của một hoặc nhiều của vùng VH của kháng thể theo sáng chế hoặc trình tự axit amin của một hoặc nhiều của vùng VL của kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, và trình tự polypeptit khác loại.

Theo một phương án khác, protein dung hợp để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán và điều trị được đề cập trong bản mô tả này bao gồm, bao gồm chủ yếu, hoặc gồm polypeptit có trình tự axit amin của một, hai, ba CDR của vùng VH của kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, hoặc trình tự axit amin của một, hai, ba of the CDR của vùng VL kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, và trình tự polypeptit khác loại. Theo một phương án, protein dung hợp bao gồm polypeptit có trình tự axit amin của ít nhất một vùng VH của kháng thể kháng CD100 theo sáng chế và trình tự axit amin của ít nhất một vùng VL của kháng thể kháng CD100 theo sáng chế hoặc mảnh, dẫn xuất hoặc biến thể của nó, và trình tự polypeptit khác loại. Tốt hơn, nếu VH và vùng VL của protein dung hợp tương ứng với kháng thể một chuỗi (hoặc scFv hoặc mảnh Fab) liên kết đặc hiệu với ít nhất một epitop của CD100. Theo một phương án khác, protein dung hợp để sử dụng phương pháp chẩn đoán và điều trị được đề cập trong bản mô tả này bao gồm polypeptit có trình tự axit amin của một, hai, ba hoặc nhiều hơn CDR của vùng VH của kháng thể kháng CD100 và trình tự axit amin của một, hai, ba hoặc nhiều hơn ba

CDR của vùng VL của kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó, và trình tự polypeptit khác loại. Tốt hơn, nếu hai, ba, bốn, năm, sáu, hoặc nhiều hơn sáu CDR của vùng VH hoặc vùng VL tương ứng với kháng thể một chuỗi (hoặc scFv hoặc mảnh Fab) theo sáng chế. Phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp cũng được đề cập theo sáng chế.

Protein dung hợp đã được báo cáo trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm thể dung hợp của thụ thể tế bào T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, *Nature* 337:525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature* 339:68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *ADN Cell Biol. USA* 9:347-353 (1990); và Byrn *et al.*, *Nature* 344:667-670(1990)); L-selectin (thụ thể hướng tế bào) (Watson *et al.*, *J. Cell. Biol.* 110:2221-2229 (1990); và Watson *et al.*, *Nature* 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell* 61:1303-1313 (1990)); CD28 và B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66:1133-1144 (1991)); thụ thể TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27:2883-2886 (1991); và Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991)); và thụ thể IgE (Ridgway và Gorman, *J. Cell. Biol.* Vol. 115, Abstract No. 1448 (1991)).

Như đã được bàn luận trong bản mô tả này, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được dung hợp với polypeptit khác loại để gia tăng thời gian bán hủy *in vivo* của polypeptit hoặc để sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, theo một phương án, PEG có thể được liên hợp với kháng thể kháng CD100 theo sáng chế để gia tăng thời gian bán hủy *in vivo*. Tham khảo Leong *et al.*, *Cytokine* 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); hoặc Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions* 30:512 (2002).

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được dung

hợp với trình tự chỉ thị, như peptit để hỗ trợ quá trình tinh chế hoặc phát hiện. Theo các phương án được ưu tiên, trình tự axit amin chỉ thị là hexa-histidin peptit, như tag được tạo ra trong vectơ pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), trong số đó, nhiều trình tự đã được bán trên thị trường. Như được đề cập trong Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), chẳng hạn, hexa-histidin sẽ giúp tinh chế protein dung hợp thuận tiện hơn. Các đuôi peptit khác hữu dụng để tinh chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, “HA” tag tương ứng với epitop thu được từ protein hemagglutinin của virus cúm (Wilson *et al.*, *Cell* 37:767 (1984)) và “flag” tag.

Protein dung hợp có thể được tạo ra sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (tham khảo, chẳng hạn Patent Mỹ số 5,116,964 và 5,225,538). Vị trí chính xác tại đó thể dung hợp được tạo ra có thể được chọn theo kinh nghiệm để tối ưu quá trình tiết hoặc đặc tính liên kết của protein dung hợp. ADN mã hóa protein dung hợp sau đó sẽ được chuyển nhiễm vào tế bào chủ để biểu hiện.

Phân tử liên kết kháng CD100, chẳng hạn, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được sử dụng ở dạng không liên hợp hoặc có thể được liên hợp với ít nhất một phân tử, chẳng hạn, để gia tăng đặc tính trị liệu của phân tử, để hỗ trợ quá trình phát hiện đích, hoặc để thực hiện chẩn đoán hình ảnh hoặc điều trị cho bệnh nhân. Phân tử liên kết kháng CD100, chẳng hạn, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được đánh dấu hoặc liên hợp trước hoặc sau khi tinh chế, hoặc trong khi quá trình tinh chế được thực hiện.

Cụ thể, kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được liên hợp với chất trị liệu, tiền được chất, peptit, protein, enzym, virus, lipid, chất điều biến đáp ứng sinh học, được chất, hoặc PEG.

Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng thể liên hợp cũng có thể được lắp ghép sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau phụ thuộc vào hoạt chất cần liên hợp được chọn. Chẳng hạn, thể liên hợp với biotin sẽ được tạo ra, chẳng hạn, bằng

cách cho polypeptit liên kết phản ứng với este được hoạt hóa của biotin như biotin N-hydroxysuccinimide este. Tương tự, thể liên hợp với chỉ thị huỳnh quang có thể được tạo ra khi có hoạt chất liên kết, *chẳng hạn*, các hoạt chất được nêu ở đây hoặc bằng phản ứng với isothioxyanat, tốt hơn là fluorescein-isothioxyanat. Thể liên hợp của kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, được tạo ra theo phương pháp đồng phân hóa.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, liên hợp với chất chẩn đoán hoặc chất trị liệu. Kháng thể kháng CD100, bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, và dẫn xuất của nó, có thể được sử dụng trong chẩn đoán để, *chẳng hạn*, theo dõi sự phát triển hoặc diễn tiến của một bệnh như một phần của quy trình xét nghiệm lâm sàng để, *chẳng hạn*, đánh giá hiệu quả của một chế độ điều trị và/hoặc ngăn ngừa nhất định. *Chẳng hạn*, quá trình phát hiện có thể được hỗ trợ bằng cách liên kết kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, với một cơ chất có thể phát hiện được. Ví dụ về cơ chất có thể phát hiện được bao gồm enzyme, nhóm giả, vật liệu huỳnh quang, vật liệu quang hóa, vật liệu quang hóa sinh học, vật liệu phóng xạ, kim loại phát positron sử dụng các kỹ thuật chụp cắt lớp phát positron khác nhau, và ion kim loại thuận từ không phóng xạ. Tham khảo, *chẳng hạn*, Patent Mỹ số 4,741,900 về ion kim loại có thể được liên hợp to kháng thể để sử dụng là chất chẩn đoán theo sáng chế. Ví dụ về enzyme bao gồm horseradish peroxidaza, phosphatasa kiềm, β -galactosidaza, hoặc acetylcholinesteaza; ví dụ về phức hệ nhóm giả thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; ví dụ về vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, fluorescein, fluorescein isothioxyanat, rhodamin, dichlorotriazinylamin fluorescein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về vật liệu quang hóa bao gồm luminol; ví dụ về vật liệu quang hóa sinh học bao gồm luciferaza, luciferin, và aequorin; và ví dụ về vật liệu phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y , hoặc ^{99}Tc .

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được liên hợp với gốc có tính trị liệu

như độc tố tế bào, chất trị liệu hoặc ion kim loại phóng xạ. Độc tố tế bào hoặc chất gây độc tế bào bao gồm chất bất kỳ có hại cho tế bào.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, cũng được đánh dấu phát hiện bằng cách liên kết với hợp chất quang hóa. Sự có mặt của phân tử liên kết kháng CD100 được gắn hợp chất quang hóa sẽ được xác định bằng cách phát hiện sự có mặt của vật liệu phát sáng do phản ứng hóa học. Ví dụ về chất đánh dấu phát quang hóa học đặc hiệu hữu dụng là luminol, isoluminol, theromatic acridinium este, imidazol, muối acridinium và oxalate este.

Một phương pháp trong đó kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được đánh dấu phát hiện là liên kết với enzym và sử dụng sản phẩm liên kết đó trong thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 31:507-520 (1978); Butler, *Meth. Enzymol.* 73:482-523 (1981); Maggio, ed. (1980) Thử nghiệm miễn dịch enzym, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa *et al.*, eds. (1981) Thử nghiệm miễn dịch enzym (Kgakaku Shoin, Tokyo). Enzym được gắn với kháng thể kháng CD100 sẽ phản ứng với một cơ chất thích hợp, thường là cơ chất tạo màu, theo kiểu để tạo ra gốc hóa học có thể được phát hiện, chẳng hạn, bằng phương pháp quang phổ, đo huỳnh quang hoặc bằng mắt thường. Enzym có thể được sử dụng để đánh dấu phát hiện kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, malat dehydrogenaza, staphylococcal nucleaza, delta-5-steroid isomeraza, dehydrogenaza rượu của nấm men, alpha-glycerophosphat, dehydrogenaza, triose phosphat isomeraza, horseradish peroxidaza, phosphataza kiềm, asparaginaza, glucoza oxidaza, beta-galactosidaza, ribonucleaza, ureaza, catalaza, glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, glucoamylaza và axetylcholinesteaza. Ngoài ra, quá trình phát hiện có thể được thực hiện bằng phương pháp đo màu sử dụng cơ chất tạo màu đối với enzym. Quá trình phát hiện cũng có thể được thực hiện bằng cách so sánh bằng mắt thương mức độ của phản ứng enzym của cơ chất so với chất chuẩn được tạo ra tương tự.

Quá trình phát hiện cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều loại thử nghiệm miễn dịch. Chẳng hạn, bằng cách đánh dấu phóng xạ phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể phát hiện phân tử liên kết thông qua việc sử dụng thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA) (tham khảo, chẳng hạn, Weintraub (March, 1986) Principles of Radioimmunoassay, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques (The Endocrine Society)). Đồng vị phóng xạ có thể được phát hiện bằng phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đếm gamma, đếm nhấp nháy, hoặc chụp ảnh phóng xạ tự động.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, cũng có thể được đánh dấu phát hiện sử dụng kim loại phát huỳnh quang như ^{152}Eu , hoặc các kim loại khác thuộc nhóm lanthanide. Các kim loại này có thể được gắn vào phân tử liên kết sử dụng nhóm tạo cang kim loại như axit dietyltriampentaxetic (DTPA) hoặc axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA).

Kỹ thuật để liên hợp các gốc khác nhau với kháng thể (*chẳng hạn*, kháng thể kháng CD100), hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, đã được biết rõ, tham khảo, *chẳng hạn*, Amon et al. (1985) "Monoclonal Antibody for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibody and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-56; Hellstrom et al. (1987) "Antibody for Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2nd ed.; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-53; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxins in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibody '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al., pp. 475-506; "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibody for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al., Academic Press, pp. 303-16 (1985); and Thorpe et al. (1982) "The Preparation and Cytotoxic Properties của Antibody-Toxin Conjugate," Immunol. Rev. 62:119-58.

VI. Quá trình biểu hiện polypeptit kháng thể

Trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được tạo ra đồng thời hoặc riêng biệt, sử dụng transcriptaza ngược và ADN polymeraza theo các phương pháp đã biết. PCR có thể được tiến hành sử dụng đoạn mỗi vùng cố định liên tục hoặc đoạn mỗi đặc hiệu hơn dựa trên trình tự ADN và trình tự axit amin đã được công bố của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Như đã nêu, PCR cũng có thể được sử dụng để phân lập thể tách dòng ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Trong trường hợp này, ngân hàng có thể được sàng lọc bằng các đoạn mỗi liên tục hoặc đầu dò đồng dạng lớn hơn, như đầu dò vùng cố định của chuột.

ADN, thường là ADN plasmit, có thể được phân lập từ tế bào sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, được lập bản đồ cắt giới hạn và đọc trình tự theo các kỹ thuật đã biết được thể hiện chi tiết, *chẳng hạn*, trong phần tài liệu tham khảo liên quan đến kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Đương nhiên, ADN có thể có nguồn gốc tổng hợp theo sáng chế tại bất kỳ điểm nào trong quá trình phân lập hoặc phân tích tiếp theo.

Sau khi biến đổi vật liệu di truyền được phân lập để tạo ra kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế, polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD100 sẽ được xen vào vector biểu hiện để đưa vào tế bào chủ có thể được sử dụng để tạo ra lượng kháng thể kháng CD100 mong muốn.

Quá trình biểu hiện tái tổ hợp kháng thể, hoặc mảnh, dẫn xuất hoặc đồng phân của nó, *chẳng hạn*, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể liên kết với phân tử đích được đề cập trong bản mô tả này, *chẳng hạn*, CD100, cần phải có vector biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa kháng thể. Khi polynucleotit mã hóa phân tử kháng thể hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc một phần của nó (tốt hơn là chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ), theo sáng chế đã thu được, vector để sản xuất phân tử kháng thể có thể được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, phương pháp để tạo ra protein bằng cách biểu hiện polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể được đề cập

trong bản mô tả này. Phương pháp đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo vector biểu hiện chứa trình tự mã hóa kháng thể và tín hiệu kiểm soát phiên mã và dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm, chẳng hạn, kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp, và tái tổ hợp di truyền *in vivo*. Do đó, sáng chế đề cập đến vector có khả năng sao chép bao gồm trình tự nucleotit mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế, hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó, hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, được liên kết linh động với đoạn khởi đầu. Vector có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa vùng cố định của phân tử kháng thể (tham khảo, *chẳng hạn*, Công bố PCT WO 86/05807; Công bố PCT WO 89/01036; và Patent Mỹ số 5,122,464) và vùng biến đổi của kháng thể có thể được tách dòng vào vector để biểu hiện toàn bộ chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ “vector” hoặc “vector biểu hiện” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là vector được sử dụng theo sáng chế như chất dẫn để đưa vào và biểu hiện gen mong muốn trong tế bào chủ. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rằng vector có thể được chọn từ nhóm bao gồm plasmid, thể thực khuẩn, virus và retrovirus. Nói chung, vector tương thích với sáng chế sẽ bao gồm chỉ thị chọn lọc, vị trí cắt giới hạn thích hợp để hỗ trợ quá trình tách dòng gen mong muốn và khả năng xâm nhập và/hoặc sao chép trong tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào chưa có nhân điển hình.

Theo sáng chế, có thể sử dụng nhiều loại vector biểu hiện. Chẳng hạn, một lớp vector sử dụng ADN thu được từ virus động vật như virus gây bệnh u nhú ở bò, virus polyoma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV hoặc MOMLV) hoặc SV40 virus. Các lớp khác sử dụng hệ polycistron với vị trí gắn ribosom bên trong. Ngoài ra, tế bào đã kết hợp ADN vào nhiễm sắc thể có thể được chọn bằng cách đưa một hoặc nhiều chỉ thị chọn lọc tế bào chủ đã được biến nạp. Chỉ thị có thể tạo ra đặc tính nguyên dưỡng cho vật chủ thụ dưỡng, kháng bioxít (*chẳng hạn*, kháng sinh) hoặc kháng kim loại nặng như đồng. Gen chỉ thị chọn lọc có thể được liên kết trực tiếp với trình tự ADN cần được biểu hiện, hoặc đưa vào cùng một tế bào bằng cách đồng biến nạp. Các yếu tố hỗ trợ cũng có thể là cần thiết để tổng hợp tối ưu ARN thông tin. Các yếu tố này có thể bao gồm trình tự tín hiệu, trình tự cắt ghép, cũng như đoạn khởi đầu phiên mã, yếu tố tăng cường, và trình tự kết thúc phiên mã.

Theo các phương án được ưu tiên đặc biệt, gen vùng biến đổi được tách dòng sẽ được xen vào vector biểu hiện cùng với gen vùng cố định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (tốt hơn là của người) được tổng hợp như đã nêu. Đương nhiên, vector biểu hiện có khả năng gây ra quá trình biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình có thể được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ về vector thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở plasmid pcADN3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, và pZeoSV2 (của Invitrogen, San Diego, Calif.), và plasmid pCI (của Promega, Madison, Wis.). Nói chung, việc sàng lọc một số lượng tế bào được biến nạp để chọn tế bào biểu hiện nồng độ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch cao thích hợp là một quy trình thường quy có thể được thực hiện bằng hệ thống robot, chẳng hạn.

Nói chung, khi vector hoặc trình tự ADN mã hóa tiểu đơn vị đơn phân của kháng thể kháng CD100 đã được tạo ra, vector biểu hiện có thể được đưa vào một tế bào chủ thích hợp. Việc đưa plasmid vào tế bào chủ có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biến nạp (bao gồm điện di và biến nạp điện), dung hợp tế bào nguyên sinh, kết tủa canxi phosphat, dung hợp tế bào với ADN được bao gói, tiêm vi mô, và nhiễm virus nguyên vẹn. Tham khảo, Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vector" in Vectors, ed. Rodriguez and Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Chapter 24.2, pp. 470-472. Thông thường, việc đưa plasmid vào tế bào chủ được thực hiện qua phương pháp biến nạp điện. Tế bào chủ chứa cấu trúc biểu hiện được nuôi cấy ở điều kiện thích để tạo ra chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, và được thử nghiệm để phát hiện quá trình tổng hợp protein chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Kỹ thuật thử nghiệm bao gồm thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA), hoặc phân tích chọn lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS), hóa mô miễn dịch và tương tự.

Vector biểu hiện được chuyển vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật thường quy, và tế bào được chuyển nhiễm sau đó được nuôi cấy bằng các kỹ thuật thường quy để tạo ra kháng thể để sử dụng trong phương pháp được đề cập trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế bao gồm tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế, hoặc

chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó, được liên kết linh động với đoạn khởi đầu khác loại. Theo các phương án được ưu tiên đối với quá trình biểu hiện kháng thể hai chuỗi, vector mã hóa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng biểu hiện trong tế bào chủ để biểu hiện toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “tế bào chủ” dùng để chỉ tế bào mang vector được thiết kế bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp và mã hóa ít nhất một gen khác loại. Trong phần mô tả quá trình phân lập kháng thể từ tế bào chủ tái tổ hợp, thuật ngữ “tế bào” và “dịch nuôi cấy tế bào” được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ nguồn kháng thể trừ khi được quy định cụ thể. Nói cách khác, việc khôi phục polypeptit từ “tế bào” có thể bằng phương pháp phá vỡ tế bào nguyên vẹn, hoặc từ dịch nuôi cấy tế bào chứa cả môi trường và tế bào được phân tán.

Một loạt hệ thống tế bào chủ-vector biểu hiện có thể được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể để sử dụng trong phương pháp được đề cập trong bản mô tả này. Hệ tế bào chủ-vector biểu hiện là chất dẫn nhờ đó trình tự mã hóa cần quan tâm có thể được tạo ra và sau đó tinh chế, nhưng cũng là tế bào có thể, khi được biến nạp hoặc chuyển nhiễm trình tự nucleotit mã hóa thích hợp, sẽ biểu hiện phân tử kháng thể theo sáng chế *in situ*. Hệ thống này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi sinh vật như vi khuẩn (*chẳng hạn*, *E. coli*, *B. subtilis*) được biến nạp ADN tái tổ hợp của thể thực khuẩn, vector biểu hiện ADN plasmit hoặc ADN cosmit chứa trình tự mã hóa kháng thể; nấm men (*chẳng hạn*, *Saccharomyces*, *Pichia*) được biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp của nấm men chứa trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào côn trùng được nhiễm vector biểu hiện tái tổ hợp của virus (*chẳng hạn*, baculovirus) chứa trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào thực vật được nhiễm vector biểu hiện tái tổ hợp của virus (*chẳng hạn*, virus khảm súp-lơ, CaMV; virus khảm thuốc lá, TMV) hoặc được biến nạp vector biểu hiện plasmit tái tổ hợp (*chẳng hạn*, Ti plasmit) chứa trình tự mã hóa kháng thể; hoặc hệ tế bào động vật có vú (*chẳng hạn*, tế bào COS, CHO, BLK, 293, 3T3) chứa cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa đoạn khởi đầu thu được từ hệ gen của tế bào động vật có vú (*chẳng hạn*, đoạn khởi đầu metallothionein) hoặc từ virus của động vật có vú (*chẳng hạn*, đoạn khởi đầu muộn của adenovirus; đoạn khởi đầu 7,5K của virus vaccinia). Tốt hơn, nếu tế bào vi khuẩn như *Escherichia coli*, và tốt hơn, nếu tế bào có

nhân điển hình, đặc biệt là đối với quá trình biểu hiện của phân tử kháng thể tái tổ hợp nguyên vẹn, được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể tái tổ hợp. Chẳng hạn, tế bào động vật có vú như Tế bào trứng của chuột (CHO), cùng với vector như đoạn khởi đầu sớm chủ yếu của virus tế bào khổng lồ của người là hệ biểu hiện có hiệu quả đối với kháng thể (Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

Dòng tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện protein thường có nguồn gốc động vật có vú; các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng xác định dòng tế bào chủ nào là thích hợp nhất để biểu hiện sản phẩm mong muốn của gen. Dòng tế bào chủ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CHO (Tế bào trứng của chuột), DG44 và DUXB11 (Tế bào trứng của chuột, không có DHFR), HELA (tế bào cacxinom cổ tử cung của người), CVI (dòng tế bào thận khi), COS (dẫn xuất của CVI với kháng nguyên T SV40), VERY, BHK (tế bào thận của chuột lang non), MDCK, 293, WI38, R1610 (Nguyên bào sợi của chuột lang) BALBC/3T3 (nguyên bào sợi của chuột), HAK (dòng tế bào thận chuột lang), SP2/O (tế bào u tủy của chuột), P3.times,63-Ag3,653 (tế bào u tủy của chuột), BFA-1c1BPT (tế bào nội bì của bò), RAJI (tế bào lympho của người) và 293 (tế bào thận người). Tế bào chủ thường có sẵn trên thị trường, có bán bởi American Tissue Culture Collection hoặc trong các tài liệu đã được công bố.

Ngoài ra, dòng tế bào chủ có thể được chọn là dòng tế bào chủ có khả năng điều biến quá trình biểu hiện của trình tự được xen vào, hoặc biến đổi và xử lý sản phẩm của gen theo một kiểu đặc hiệu. Các biến đổi (*chẳng hạn*, glycosyl hóa) và xử lý (*chẳng hạn*, phân cắt) protein có thể là quan trọng đối với chức năng của protein. Các tế bào chủ khác nhau sẽ có đặc điểm và cơ chế đặc hiệu để xử lý và biến đổi sau dịch mã protein và sản phẩm của gen. Dòng tế bào hoặc hệ tế bào chủ thích hợp có thể được chọn để đảm bảo quá trình biến đổi và xử lý chính xác protein ngoại lai cần biểu hiện. Để thực hiện mục tiêu này, tế bào chủ có nhân có cơ chế xử lý thích hợp bản sao phiên mã sơ cấp, glycosyl hóa, và phosphoryl hóa sản phẩm của gen có thể được sử dụng.

Để sản xuất với sản lượng cao và lâu dài protein tái tổ hợp, cần phải có quá trình biểu hiện ổn định. Chẳng hạn, dòng tế bào biểu hiện ổn định phân tử kháng thể có thể được xử lý. Thay vì sử dụng vector biểu hiện chứa điểm khởi đầu sao chép của virus, tế bào chủ có thể được biến nạp ADN được kiểm soát bằng yếu tố kiểm soát biểu hiện thích hợp (*chẳng hạn*, đoạn khởi đầu, trình tự tăng cường, yếu tố kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, v.v.), và chỉ thị có thể chọn lọc. Sau khi đưa ADN ngoại lai vào, tế bào được xử lý có thể được nuôi cấy trong 1 đến 2 ngày trong môi trường được làm giàu, và sau đó được chuyển sang môi trường chọn lọc. Chỉ thị có thể chọn lọc trong plasmid tái tổ hợp sẽ tạo ra tính kháng với quá trình chọn lọc và cho phép tế bào kết hợp một cách ổn định plasmid vào nhiễm sắc thể của chúng và sinh trưởng tạo thành các đám tế bào, đám tế bào có thể được tách dòng và phát triển thành dòng tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng để biến đổi dòng tế bào biểu hiện ổn định phân tử kháng thể.

Một số hệ chọn lọc có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thymidine kinaza của virus herpes simplex (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223 (1977)), hypoxanthine-guanin phosphoribosyltransferaza (Szybalska và Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202 (1992)), và adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy *et al.*, *Cell* 22:817 (1980)) có thể được sử dụng lần lượt trong các tế bào tk-, hgprt- hoặc aprt-. Tương tự, tính kháng chất chống chuyển hóa cũng có thể được sử dụng làm cơ sở chọn lọc các gen sau: dhfr, tạo ra tính kháng với methotrexat (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, tạo ra tính kháng với axit mycophenolic (Mulligan và Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, tạo ra tính kháng với aminoglycosit G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu và Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); và Morgan và Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-215 (May, 1993); và hygromycin, tạo ra tính kháng với hygromycin (Santerre *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)). Phương pháp này đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật ADN tái tổ hợp và được đề cập trong tài liệu Ausubel *et al.* (1993) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY); Kriegler (1990) "Gene Transfer và Expression" in

A Laboratory Manual (Stockton Press, NY); Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Chapters 12 và 13; Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1.

Mức độ biểu hiện của phân tử kháng thể có thể được gia tăng bằng phương pháp khuếch đại vector (tham khảo Bebbington và Hentschel (1987) "The Use of Vector Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mamalian Cell in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3. Khi chỉ thị trong hệ vector biểu hiện kháng thể là có khả năng khuếch đại, sự gia tăng nồng độ chất ức chế có trong dịch nuôi cấy tế bào chủ sẽ làm gia tăng số lượng bản sao của gen chỉ thị. Vì vùng được khuếch đại có liên quan đến gen kháng thể, nên mức độ sản xuất kháng thể cũng sẽ gia tăng (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

Việc sản xuất *in vitro* cho phép việc mở rộng quy mô để tạo ra một lượng lớn polypeptit mong muốn. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật có vú trong điều kiện nuôi cấy mô đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm nuôi cấy trong hỗn dịch đồng nhất, *chẳng hạn* trong một bình phản ứng khí nén hoặc trong bình phản ứng khuấy liên tục, hoặc dịch nuôi cấy tế bào được cố định, *chẳng hạn* trong các sợi rỗng, vi nang, trên các vi hạt agarose hoặc hạt ceramic. Nếu cần và/hoặc nếu muốn, dung dịch polypeptit có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký thường quy, *chẳng hạn* lọc gel, sắc ký trao đổi ion, sắc ký trên DEAE-xenluloza hoặc sắc ký ái lực (miễn dịch), *chẳng hạn*, sau khi sinh tổng hợp polypeptit vùng bản lẻ có nguồn gốc tổng hợp hoặc trước hoặc sau khi sắc ký HIC như được đề cập trong bản mô tả này.

Gen mã hóa kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế cũng có thể được biểu hiện trong tế bào không phải tế bào động vật có vú như côn trùng, vi khuẩn hoặc nấm men hoặc tế bào thực vật. Vi khuẩn có khả năng hấp thu axit nucleic bao gồm vi khuẩn thuộc họ vi khuẩn đường ruột, như chủng *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; *Bacillaceae*, như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, và *Haemophilus influenzae*. Có thể nhận thấy rằng khi được biểu hiện trong vi khuẩn, polypeptit khác loại thường được tạo ra ở dạng thể vùi. Do đó polypeptit khác loại cần được phân lập, tinh chế và sau đó lắp ghép vào

phân tử chức năng. Khi dạng tứ trị của kháng thể lần cần thiết, các tiểu đơn vị sẽ tự lắp ghép để tạo thành kháng thể tứ trị (WO 02/096948A2).

Trong hệ vi khuẩn, một số vector biểu hiện có thể được chọn lọc phụ thuộc vào mục đích sử dụng của phân tử kháng thể được biểu hiện. Chẳng hạn, khi cần sản xuất một lượng lớn protein, để sản xuất được phẩm chứa phân tử kháng thể, vector có khả năng biểu hiện protein dung hợp ở mức độ cao là cần thiết. Vector như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở vector biểu hiện pUR278 của *E. coli* (Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2:1791 (1983)), trong đó trình tự mã hóa kháng thể có thể được gắn một cách riêng biệt vào vector cùng khung với vùng mã hóa lacZ để có thể tạo ra protein dung hợp; vector pIN (Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke and Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); và tương tự. Vector pGEX cũng có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit ngoại lai ở dạng protein dung hợp với glutathion S-transferaza (GST). Nói chung, protein dung hợp có khả năng hòa tan và có thể được tinh chế một cách thuận tiện từ định phân giải tế bào bằng phương pháp hấp phụ và liên kết với hạt chất nền có nguồn gốc glutathion sau đó là tách rửa khi có glutathion tự do. Vector pGEX được thiết kế để bao gồm thrombin hoặc vị trí phân cắt proteaza yếu tố Xa để sản phẩm của gen đích được tách dòng có thể được giải phóng từ gốc GST.

Ngoài vi sinh vật chưa có nhân điển hình, cũng có thể sử dụng vi sinh vật có nhân điển hình. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc nấm men bánh mỳ, thường được sử dụng nhiều nhất trong số vi sinh vật có nhân điển hình mặc dù một số các chủng khác cũng khả dụng, chẳng hạn, *Pichia pastoris*.

Để biểu hiện trong *Saccharomyces*, plasmit YRp7, chẳng hạn, (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene* 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene* 10:157 (1980)) thường hay được sử dụng. Plasmit này đã có sẵn gen TRP1, là chỉ thị chọn lọc chủng nấm men đột biến không có khả năng sinh trưởng trong tryptophan, chẳng hạn ATCC No. 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85:12 (1977)). Sự có mặt tổn thương trp1 là đặc điểm của hệ gen tế bào chủ nấm men sẽ tạo ra một

môi trường hiệu quả để phát hiện thể biến nạp nhờ quá trình sinh trưởng khi không có mặt tryptophan.

Trong hệ tế bào côn trùng, virus nhân đa diện *Autographa californica* (AcNPV) thường được sử dụng làm vector để biểu hiện gen ngoại lai. Virus sinh trưởng trong tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mã hóa kháng thể có thể được tách dòng riêng biệt vào vùng không thiết yếu (chẳng hạn gen polyhedrin) của virus và đặt dưới sự kiểm soát của đoạn khởi đầu AcNPV (chẳng hạn đoạn khởi đầu polyhedrin).

Khi phân tử kháng thể theo sáng chế đã được biểu hiện tái tổ hợp, nó có thể được tinh chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tinh chế phân tử globulin miễn dịch, chẳng hạn, bằng sắc ký (*chẳng hạn*, trao đổi ion, ái lực, đặc biệt là ái lực đối với kháng nguyên đặc hiệu sau protein A, và sắc ký cột kích thước), ly tâm, độ tan phân biệt, hoặc bằng một kỹ thuật quy chuẩn bất kỳ để tinh chế protein. Theo một cách khác, phương pháp được ưu tiên để gia tăng ái lực của kháng thể theo sáng chế được đề cập trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền Mỹ số 2002 0123057 A1.

VII. Phương pháp điều trị sử dụng kháng thể điều trị kháng CD100

Phương pháp theo sáng chế được đề cập để sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, và dẫn xuất của nó, để điều trị bệnh nhân có bệnh liên quan đến CD100 hòa tan được tiết từ hoặc được biểu hiện trên tế bào biểu hiện CD100. Thuật ngữ “tế bào biểu hiện CD100” là tế bào bình thường và tế bào ác tính biểu hiện kháng nguyên CD100. Phương pháp phát hiện quá trình biểu hiện CD100 trong tế bào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật PCR, hóa mô miễn dịch, phương pháp đo dòng chảy tế bào, thẩm tách Western, ELISA, và tương tự.

Mặc dù phần mô tả sau đây đề cập đến phương pháp chẩn đoán và điều trị bệnh và rối loạn bằng kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, phương pháp được đề cập trong bản mô tả này cũng có thể được áp dụng cho mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, và dẫn xuất của kháng thể kháng CD100 vẫn giữ được hoạt tính mong muốn của

kháng thể kháng CD100 theo sáng chế, *chẳng hạn*, có khả năng liên kết đặc hiệu với CD100, *chẳng hạn*, người, chuột, hoặc CD100 của người và của chuột, và có hoạt tính trung hòa CD100.

Theo một phương án, điều trị bao gồm việc ứng dụng hoặc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế cho bệnh nhân, hoặc ứng dụng hoặc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100 với mô hoặc dòng tế bào được phân lập từ bệnh nhân, trong đó bệnh nhân có bệnh, triệu chứng của bệnh, hoặc xu hướng mắc bệnh. Theo một phương án khác, điều trị cũng bao gồm việc ứng dụng hoặc sử dụng được phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế cho bệnh nhân, hoặc ứng dụng hoặc sử dụng được phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng CD100 với mô hoặc dòng tế bào được phân lập từ bệnh nhân, trong đó bệnh nhân có bệnh, triệu chứng của bệnh, hoặc xu hướng mắc bệnh.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế là hữu dụng để điều trị khối u ác tính và không ác tính khác nhau. Thuật ngữ “hoạt tính kháng khối u” nghĩa là sự giảm mức độ tăng sinh hoặc tích lũy của tế bào biểu hiện CD100 ác tính, và do đó là sự giảm tốc độ sinh trưởng của khối u hoặc trong khối u phát triển trong khi điều trị, và/hoặc phá vỡ tế bào ung thư đã có (khối u) hoặc tế bào ung thư mới hình thành, và do đó là giảm kích thước toàn phần của khối u trong quá trình điều trị. Chẳng hạn, điều trị bằng ít nhất một kháng thể kháng CD100 tạo ra đáp ứng sinh lý, chẳng hạn, giảm quá trình tạo mạch, là có lợi về mặt điều trị bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện CD100 ở người.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế để sử dụng làm thuốc, cụ thể để sử dụng trong điều trị hoặc điều trị dự phòng ung thư hoặc để sử dụng trong điều trị tổn thương hoặc tình trạng tiền ung thư. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế được sử dụng để điều trị ung thư biểu hiện quá mức CD100. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*,

kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế được sử dụng để điều trị ung thư vùng đầu và cổ hoặc đại tràng biểu hiện quá mức CD100.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để ức chế quá trình tạo mạch để điều trị tình trạng bệnh lý phụ thuộc vào quá trình hình thành mạch máu mới, bao gồm quá trình phát triển khối u và thoái hóa điểm vàng. Tạo mạch là một quá trình tạo hình thái nhiều bước trong đó tế bào nội bì, được kích thích bằng các yếu tố quyết định chính của quá trình tái tạo hình mạch, biến đổi mối liên hệ tế bào-tế bào và tế bào-chất nền của chúng, và di chuyển một cách trực tiếp để được tái tổ chức vào một hệ mạch trưởng thành (Bussolino *et al.*, *Trends Biochem Sci.* 22:251-256 (1997); Risau, *Nature* 386:671-674 (1997); Jain, *Nat. Med.* 9:685-693 (2003)). Sự hình thành mạch máu mới là một bước chủ chốt trong quá trình phát triển phôi, nhưng quá trình này cũng xảy ra ở người lớn trong các tình trạng sinh lý và bệnh lý, như bệnh vớng mạc, viêm khớp dạng thấp, thiếu máu cục bộ, và đặc biệt là sự sinh trưởng khối u và di căn (Carmeliet, *Nat. Med.* 9:653-660 (2003)). Sự hình thành bệnh lý các mạch máu mới ở đây được gọi là “tạo mạch xâm nhập.” Basile *et al.*, *PNAS* 103(24):9017-9022 (2006)) đã chứng minh rằng, khi được tách ra khỏi tế bào HNSCC, CD100 sẽ kích thích sự di cư của tế bào nội bì, quá trình này sẽ bị ngăn chặn bởi kháng thể kháng CD100 và nhờ quá trình phân hủy CD100. Quá trình biểu hiện quá mức CD100 cũng được ghi nhận ở tình trạng ung thư tuyến tiền liệt, đại tràng, vú, và phổi, chỉ ra rằng quá trình biểu hiện CD100 thường là một quá trình thường gặp nhờ đó một loạt các ung thư cacxinom có thể kích thích quá trình tạo mạch.

Theo phương pháp theo sáng chế, ít nhất một phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, sẽ được sử dụng để kích đáp ứng điều trị dương tính đối với tế bào ác tính của người. Thuật ngữ “đáo ứng điều trị tích cực” với điều trị ung thư có nghĩa là sự cải thiện tình trạng bệnh đi kèm với hoạt tính kháng khối u của phân tử liên kết, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh của nó, và/hoặc sự cải thiện triệu chứng liên quan đến the bệnh. Nghĩa là, tác dụng chống tăng sinh, ngăn ngừa sự phát triển khối u quá mức, giảm kích thước khối u, giảm hệ mạch khối u, giảm số lượng tế bào ung thư, và/hoặc giảm một hoặc nhiều triệu chứng

liên quan đến the bệnh có thể phát hiện được. Do đó, chẳng hạn, sự cải thiện bệnh có thể đặc trưng bởi đáp ứng hoàn toàn. Thuật ngữ “đáp ứng hoàn toàn” là không có bệnh có thể phát hiện được trên lâm sàng với sự trở về trạng thái bình thường của kết quả xét nghiệm chẩn đoán hình ảnh, tủy xương, và dịch não tủy (CSF) bất thường trước đó. Đáp ứng như trên cần kéo dài ít nhất một tháng sau điều trị theo phương pháp theo sáng chế. Theo một cách khác, sự cải thiện bệnh có thể được phân loại thành đáp ứng một phần. Thuật ngữ “đáp ứng một phần” có nghĩa là có sự giảm ít nhất khoảng 50% thông số khối u đo được (*nghĩa là*, số lượng tế bào ung thư trong đối tượng) không có tổn thương mới và kéo dài trong ít nhất một tháng. Đáp ứng như vậy chỉ áp dụng cho các khối u đo được.

Đáp ứng khối u có thể được đánh giá về sự thay đổi hình thái khối u (*nghĩa là*, kích thước khối u toàn phần, số lượng tế bào khối u, và tương tự) sử dụng kỹ thuật sàng lọc như kỹ thuật chụp ảnh phát quang sinh học, chẳng hạn, chụp ảnh luciferaza, chụp ảnh quét xương, và sinh thiết khối u bao gồm kỹ thuật chọc tủy xương (BMA). Ngoài các đảo ứng điều trị dương tính, đối tượng được điều trị bằng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có thể được hưởng lợi của sự cải thiện triệu chứng liên quan đến bệnh. Chẳng hạn, đối tượng có thể có sự giảm triệu chứng được gọi là triệu chứng B, *chẳng hạn*, mồ hôi trộm, sốt, sụt cân, và/hoặc mảy đay.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được đề cập trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng trong điều trị bệnh viêm và suy giảm hoặc rối loạn hệ miễn dịch liên quan đến tế bào biểu hiện CD100. Bệnh viêm đặc trưng bởi quá trình viêm và phá hủy mô, hoặc dạng kết hợp của chúng. Thuật ngữ “thuật ngữ kháng viêm” có nghĩa là sự giảm hoặc ngăn ngừa viêm. “Bệnh viêm” bao gồm quá trình viêm miễn dịch trong đó sự kiện khởi phát hoặc đích của đáp ứng miễn dịch có liên quan đến các kháng nguyên không thân thuộc, bao gồm, chẳng hạn, kháng nguyên lạ, kháng nguyên ghép, kháng nguyên virus, kháng nguyên vi khuẩn, kháng nguyên không rõ, hoặc chất gây dị ứng. Theo một phương án, bệnh viêm là rối loạn viêm của hệ thần kinh ngoại biên hoặc hệ thần kinh trung ương. Theo một phương án khác, bệnh viêm là rối loạn viêm của khớp.

Hơn nữa, theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh viêm” bao gồm “bệnh tự miễn.” Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tự miễn” thường được hiểu là quá trình viêm do miễn dịch liên quan đến kháng nguyên “thân thuộc”. Trong bệnh tự miễn, kháng nguyên thân thuộc sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Bệnh tự miễn có thể là do đáp ứng miễn dịch không thích hợp kháng lại trực tiếp kháng nguyên thân thuộc (tự kháng nguyên), là sự sai lệch từ trạng thái bình thường của cơ chế tự dung nạp. Nói chung, kháng thể (đặc biệt, nhưng không chỉ là IgG), là phân tử gây độc tế bào hoặc phức hệ miễn dịch, là chất trung gian cơ bản của các bệnh tự miễn khác nhau, nhiều trong số đó có thể gây tàn phế hoặc đe dọa đến tính mạng.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, theo sáng chế được sử dụng để điều trị xơ cứng rải rác (MS). MS, còn được gọi là xơ cứng lan tỏa hoặc encephalomyelitis disseminata, là một tình trạng tự miễn trong đó hệ miễn dịch tấn công hệ thần kinh trung ương, dẫn đến quá trình khử myelin hóa. Tên xơ cứng rải rác dùng để chỉ mô sẹo (xơ cứng, cũng được gọi là mảng hoặc tổn thương) hình thành ở hệ thần kinh. Tổn thương MS thường bao gồm vùng chất trắng gần với não thất của tiểu não, thân não, hạch gốc và tủy sống, và dây thần kinh thị giác. MS gây ra sự phá hủy tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào có vai trò trong việc tạo ra và duy trì lớp myelin. MS sẽ làm mỏng hoặc làm mất hoàn toàn myelin và, khi bệnh tiến triển sẽ làm đứt sợi trục.

Triệu chứng thần kinh trong MS có thể rất khác nhau, và bệnh thường diễn tiến thành khuyết tật về mặt thể chất và nhận thức. MS có một vài dạng, với triệu chứng mới xảy ra thành những cơn riêng biệt (dạng suy giảm) hoặc tích lũy từ từ theo thời gian (dạng diễn tiến). Giữa các cơn phát bệnh, triệu chứng có thể biến mất hoàn toàn, nhưng bệnh nhân thường có các tổn thương thần kinh thường, đặc biệt khi bệnh tiến triển.

Quá trình trung hòa CD100 sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD100 theo sáng chế, *chẳng hạn*, MAb 2503, MAb 67 hoặc MAb 76, có thể được sử dụng để làm giảm mức độ nghiêm trọng của MS thông qua một vài cơ chế khác nhau, *chẳng hạn*, kháng thể đơn dòng kháng CD100 có thể chặn quá trình hoàn thiện miễn dịch và hoạt

hóa bởi CD100 để làm giảm mức độ suy giảm bằng cách giảm đáp ứng miễn dịch thứ cấp kháng kháng nguyên của hệ thần kinh trung ương, và kháng thể đơn dòng kháng CD100 có thể chặn tác dụng của CD100 hòa tan trong quá trình kích thích chết theo chương trình của tế bào thần kinh đệm ít gai trong CNS có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh bằng cách giảm quá trình khử myelin hóa.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, theo sáng chế được sử dụng để điều trị viêm khớp. Viêm khớp, là tình trạng viêm của khớp, có thể là do tình trạng tự miễn gây ra trong đó hệ miễn dịch tấn công khớp. Theo một số phương án, viêm khớp được chọn từ nhóm bao gồm viêm xương khớp, viêm khớp gout, viêm cứng khớp đốt sống, viêm khớp vảy nến, viêm khớp phản ứng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp thời niên thiếu, viêm khớp nhiễm trùng, viêm khớp do viêm, viêm khớp nhiễm khuẩn, viêm khớp thoái hóa, cắt cụt do viêm khớp, và viêm khớp tứ chi. Theo một phương án, viêm khớp là viêm khớp dạng thấp (RA).

Sáng chế bao gồm phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa viêm khớp bằng cách sử dụng cho đối tượng phân tử liên kết kháng CD100 theo sáng chế, *chẳng hạn*, MAb 2503, MAb 67 hoặc MAb 76. Phương pháp theo sáng chế có thể làm giảm đau, sưng hoặc cứng liên quan đến viêm khớp, *chẳng hạn*, viêm khớp dạng thấp. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu năng, chức năng, và sức khỏe của khớp. Theo một số phương án theo sáng chế, điều trị sẽ gây ra sự giảm mức độ nghiêm trọng của viêm khớp, giảm mức độ nghiêm trọng viêm khớp/diện tích dưới đường cong, giảm các thông số mô bệnh học liên quan đến viêm khớp (viêm, dịch rỉ viêm khớp, tổn thương sụn, và tổn thương xương), giảm nồng độ axit arachidonic trong huyết thanh, hoặc giảm kháng thể kháng collagen. Theo một số phương án, kết quả có lợi hoặc kết quả lâm sàng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm triệu chứng liên quan đến viêm khớp; ngăn ngừa viêm khớp; làm chậm sự phát triển của viêm khớp; giảm tỷ lệ viêm khớp trong quần thể; giảm mức độ của tình trạng liên quan đến viêm khớp; ổn định hóa (nghĩa là, không làm xấu đi) tình trạng, rối loạn hoặc bệnh liên quan đến viêm khớp; làm chậm sự phát triển của tình trạng, rối loạn hoặc bệnh liên quan đến viêm khớp; giảm tình trạng, rối loạn hoặc bệnh, giảm (một phần hoặc toàn bộ) tình

trạng, rối loạn hoặc bệnh liên quan đến viêm khớp, có thể phát hiện hoặc không thể phát hiện được; hoặc gia tăng hoặc cải thiện tình trạng, rối loạn hoặc bệnh liên quan đến viêm khớp.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng bị viêm khớp hoặc đối tượng có nguy cơ bị viêm khớp. Do đó, theo một số phương án sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị đối tượng có khớp bình thường, khớp bị viêm quanh, hoặc khớp viêm nặng, phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100 theo sáng chế, *chẳng hạn*, MAb 2503, MAb 67 hoặc MAb 76, cho đối tượng như được đề cập trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị viêm khớp mạn tính cho đối tượng.

Theo phương pháp theo sáng chế, ít nhất một phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, như được định nghĩa trong bản mô tả này được sử dụng để kích thích đáp ứng điều trị dương tính với điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm. Thuật ngữ “đáp ứng điều trị dương tính” với bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm là sự cải thiện the bệnh đi kèm với thuật ngữ kháng viêm, hoạt tính kháng tạo mạch, hoạt tính kháng quá trình chết tế bào theo chương trình, hoặc tương tự, của kháng thể, và/hoặc sự cải thiện triệu chứng liên quan đến the bệnh. Nghĩa là, tác dụng chống tăng sinh, ngăn ngừa sự tăng sinh hơn nữa tế bào biểu hiện CD100, giảm đáp ứng viêm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở giảm quá trình tiết xytokin gây viêm, phân tử dính, proteaza, globulin miễn dịch (trong các trường hợp trong đó tế bào mang CD100 là tế bào B), hỗn hợp của nó, và tương tự, gia tăng quá trình sản xuất protein kháng viêm, giảm số lượng tế bào tự miễn, tăng mức độ dung nạp miễn dịch, ức chế quá trình sống sót của tế bào tự miễn, giảm quá trình chết theo chương trình, giảm sự di cư của tế bào nội bì, tăng sự di cư của tế bào đơn nhân tự phát, giảm một hoặc nhiều triệu chứng gây ra do quá trình kích thích CD100 hoặc tế bào biểu hiện CD100 có thể phát hiện được. Đáp ứng điều trị dương tính nói trên không bị giới hạn ở đường dùng và có thể bao gồm việc sử dụng cho người nhận, mô của người nhận (như *chẳng hạn* quá trình truyền vào cơ quan), vật chủ, hỗn hợp bất kỳ của chúng, và tương tự.

Đáp ứng lâm sàng có thể được đánh giá sử dụng kỹ thuật sàng lọc như chụp cộng hưởng từ (MRI), chụp x-quang, chụp cắt lớp vi tính (CT), phương pháp đo dòng chảy tế bào hoặc phân tích chọn tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS), mô học, bệnh học, và hóa huyết học, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các thay đổi có thể phát hiện bằng ELISA, RIA, sắc ký, và tương tự. Ngoài đáp ứng điều trị dương tính, đối tượng được điều trị bằng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có thể thấy tác dụng có lợi là sự cải thiện triệu chứng liên quan đến bệnh.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có thể được sử dụng cùng với ít nhất một liệu pháp ung thư khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phẫu thuật (*chẳng hạn* cắt lá lách, cắt gan, cắt bỏ hạch bạch huyết, tách bạch cầu, cấy ghép tủy xương, và tương tự); xạ trị; hóa trị liệu, tùy ý cùng với cấy ghép tủy xương tự sinh, hoặc các liệu pháp ung thư khác; trong đó liệu pháp ung thư khác hỗ trợ được sử dụng trước, trong, hoặc sau phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Do đó, khi liệu pháp kết hợp bao gồm việc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế cùng với việc sử dụng chất trị liệu khác, như hóa trị liệu, xạ trị, kháng thể kháng ung thư khác, liệu pháp ung thư khác dựa trên phân tử nhỏ, hoặc liệu pháp ung thư khác dựa trên điều trị miễn dịch, phương pháp theo sáng chế bao gồm việc đồng sử dụng, sử dụng các chế phẩm riêng biệt hoặc một dược phẩm duy nhất, hoặc và sử dụng liên tục theo trình tự bất kỳ.

Phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với một chất trị liệu đã biết để điều trị bệnh tự miễn và bệnh viêm, bao gồm hoạt chất hoặc hỗn hợp các hoạt chất bất kỳ được biết là có tác dụng, hoặc đã được sử dụng hoặc đang được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn và bệnh viêm. Do đó, khi liệu pháp kết hợp bao gồm việc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100 cùng với một 1 chất trị liệu khác, phương pháp theo sáng chế bao gồm việc đồng sử dụng, sử dụng các chế phẩm riêng biệt hoặc một dược phẩm duy nhất, hoặc và sử dụng liên tục theo trình tự bất kỳ. Theo một số

phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD100 được đề cập trong bản mô tả này sẽ được sử dụng cùng với chất ức chế miễn dịch hoặc chất chống viêm, trong đó kháng thể và chất trị liệu có thể được sử dụng theo thứ tự bất kỳ, hoặc đồng thời (*nghĩa là, đồng thời hoặc trong cùng một khoảng thời gian*).

Theo một số phương án khác, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế có thể được sử dụng riêng biệt hoặc cùng với chất ức chế miễn dịch để điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm khớp dạng thấp. Do đó, theo một số phương án khi kháng thể kháng CD100 theo sáng chế được sử dụng để điều trị viêm khớp dạng thấp, kháng thể có thể được sử dụng cùng với chất ức chế miễn dịch thích hợp. Như đã nêu, hiệu quả điều trị có thể được đánh giá bằng cách sử dụng một phương pháp bất kỳ và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiệu quả đo bằng đáp ứng lâm sàng được xác định bằng tiêu chuẩn của hội Thấp khớp của Mỹ, tiêu chuẩn thấp khớp châu Âu, hoặc một tiêu chuẩn bất kỳ. Tham khảo *chẳng hạn*, Felson *et al.*, *Arthritis. Rheum.* 38:727-35 (1995) và van Gestel *et al.*, *Viêm khớp Rheum.* 39:34-40 (1996).

Theo một phương án khác, kháng thể kháng CD100 theo sáng chế có thể được sử dụng riêng biệt hoặc cùng với chất ức chế miễn dịch để điều trị và/hoặc ngăn ngừa xơ cứng rải rác. Do đó theo một số phương án *where* kháng thể kháng CD100 theo sáng chế được sử dụng để điều trị xơ cứng rải rác, kháng thể có thể được sử dụng cùng với chất ức chế miễn dịch thích hợp.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, để theo dõi chẩn đoán nồng độ protein trong mô như là một phần của quy trình xét nghiệm lâm sàng, *chẳng hạn*, để đánh giá hiệu quả của một chế độ điều trị nhất định. *Chẳng hạn*, quá trình phát hiện có thể được hỗ trợ bằng cách kết hợp kháng thể với cơ chất có thể phát hiện được. Ví dụ về cơ chất có thể phát hiện được bao gồm enzym, nhóm giả, vật liệu huỳnh quang, vật liệu quang hóa, vật liệu quang hóa sinh học, vật liệu phóng xạ. Ví dụ về enzym bao gồm horseradish peroxidaza, phosphataza kiềm, β -galactosidaza, hoặc axetylcholinesteaza; ví dụ về phức hệ nhóm giả thích hợp bao gồm

streptavidin/biotin và avidin/biotin; ví dụ về vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, fluorescein, fluorescein isothioxyanat, rhodamin, dichlorotriazinylamin fluorescein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về vật liệu quang hóa bao gồm luminol; ví dụ về vật liệu quang hóa sinh học bao gồm luciferaza, luciferin, và aequorin; và ví dụ về vật liệu phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , hoặc ^3H .

VIII. Dược phẩm và phương pháp sử dụng

Phương pháp bào chế và sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế cho đối tượng đã được biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đường dùng phân tử liên kết kháng CD100, *e.g.*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể, chẳng hạn, qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, bằng cách xông hít hoặc ngoài ra. Thuật ngữ ngoài đường tiêu hóa Như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm, *chẳng hạn*, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong phúc mạc ổ bụng, trong cơ, dưới da, qua trực tràng, hoặc qua âm đạo. Trong khi tất cả các dạng sử dụng đều thuộc phạm vi của sáng chế, ví dụ về dạng sử dụng là dung dịch pha tiêm, cụ thể để tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch hoặc trong động mạch. Thông thường, dược phẩm thích hợp để tiêm có thể bao gồm đệm (*chẳng hạn* đệm axetat, phosphat hoặc xitrat), chất hoạt động bề mặt (*chẳng hạn* polysorbate), tùy ý chất ổn định (*chẳng hạn* albumin của người), v.v.. Tuy nhiên, theo phương pháp theo sáng chế, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế có thể được phân phối trực tiếp vào vị trí tế bào bị bệnh nhờ đó làm tăng mức độ phơi nhiễm của mô bệnh với chất trị liệu.

Như được thảo luận trong bản mô tả này, phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế có thể được sử dụng với lượng có hiệu quả điều trị để điều trị *in vivo* bệnh do tế bào biểu hiện CD100 gây ra như một số loại ung thư, bệnh tự miễn, bệnh viêm bao gồm hệ thần kinh trung ương (CNS) và hệ thần kinh ngoại biên (PNS), bệnh viêm, và tạo mạch xâm nhập. Theo khía cạnh này, có thể nhận biết rằng phân tử liên kết theo

sáng chế sẽ được bào chế để hỗ trợ quá trình sử dụng và kích thích độ ổn định của hoạt chất. Tốt hơn, nếu được phẩm theo sáng chế bao gồm chất mang vô trùng, không độc, được dụng như muối sinh lý, đệm không độc, chất bảo quản và tương tự. Theo sáng chế, lượng có hiệu quả điều trị của phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, liên hợp hoặc hoặc không liên hợp, sẽ là lượng đủ để đạt được sự liên kết có hiệu quả với đích và để đạt được lợi ích điều trị, *chẳng hạn*, để giảm nhẹ triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn hoặc để phát hiện cơ chất hoặc tế bào.

Dược phẩm được sử dụng theo sáng chế sẽ bao gồm chất mang được dụng, bao gồm, *chẳng hạn*, chất trao đổi ion, alumina, nhôm stearat, lecithin, protein huyết thanh, như albumin huyết thanh của người, đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, hỗn hợp glyxerit một phần của axit béo bão hòa trong dầu thực vật, nước, muối hoặc điện giải, như protamin sulfat, dinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, silica keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrrolidon, cơ chất dựa trên xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, polyme phong bế polyetylen-polyoxypropylen, polyetylen glycol, và dầu bông.

Dược phẩm sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch, hỗn dịch, và nhũ tương vô trùng trong nước hoặc không trong nước. Ví dụ về dung môi không phải nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, và este hữu cơ tiêm được như etyl oleat. Chất mang nước bao gồm, *chẳng hạn*, nước, dung dịch cồn/nước, nhũ tương hoặc hỗn dịch, bao gồm muối sinh lý và môi trường đệm. Theo sáng chế, chất mang được dụng có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, đệm phosphat 0,01 đến 0,1M và thường là 0,05 M hoặc muối sinh lý 0,8%. Các chất mang ngoài đường tiêu hóa khác bao gồm dung dịch natri phosphat, dung dịch Ringer dextroza, dextroza và natri clorua, Ringer lactat, hoặc dầu cố định. Chất dẫn thuốc trong tĩnh mạch bao gồm dịch lỏng và chất độn dinh dưỡng, chất độn điện giải, như các chất dựa trên Ringer dextroza, và tương tự. Chất bảo quản và chất bổ trợ khác cũng có thể có như, chẳng hạn, chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo càn, và khí trợ và tương tự.

Cụ thể hơn, dược phẩm thích hợp để tiêm bao gồm dung dịch (tan trong nước) hoặc dịch phân tán và bột vô trùng để tạo dung dịch tiêm vô trùng hoặc hỗn dịch tiêm vô trùng. Trong trường hợp này, các thành phần cần phải vô trùng và ở dạng dịch lỏng đủ để linh động trong bơm tiêm. Dược phẩm cần phải ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản và thường được bảo quản khỏi quá trình nhiễm vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, chẳng hạn, nước, ethanol, polyol (*chẳng hạn*, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và tương tự), và hỗn hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, chẳng hạn, bằng cách sử dụng chất bao như lexithin, duy trì kích thước tiểu phần cần thiết trong trường hợp thể phân tán và sử dụng chất hoạt động bề mặt. Dạng bào chế thích hợp để sử dụng trong phương pháp điều trị được đề cập trong bản mô tả này được đề cập trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Ngăn ngừa hoạt động của vi sinh vật có thể đạt được bằng cách sử dụng chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, chẳng hạn, parabens, chlorobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal và tương tự. Trong nhiều trường hợp, có thể đưa chất đẳng trương, chẳng hạn, đường, rượu đa chức, như mannitol, sorbitol, hoặc natri clorua vào trong dược phẩm. Quá trình hấp thu kéo dài dược phẩm tiêm có thể được tạo ra bằng cách đưa vào dược phẩm chất làm chậm quá trình hấp thu, chẳng hạn, nhôm monostearat và gelatin.

Trong trường hợp bất kỳ, dung dịch tiêm vô trùng có thể được tạo ra bằng cách đưa hoạt chất (*chẳng hạn*, kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, riêng biệt hoặc cùng với các hoạt chất khác) với lượng cần thiết vào dung môi thích hợp với một hoặc hỗn hợp các thành phần được nêu trong bản mô tả này, sau đó là lọc vô trùng. Nói chung, dịch phân tán sẽ được tạo ra bằng cách đưa hoạt chất vài chất dẫn thuốc vô trùng, chứa môi trường phân tán có tính bazơ và các thành phần cần thiết nêu trên. Trong trường hợp sử dụng bột vô trùng để bào chế dung dịch tiêm vô trùng, phương pháp bào chế được ưu tiên là sấy trong chân không và đông khô để tạo ra bột hoạt chất cùng với các thành phần hỗ trợ mong muốn khác từ dung dịch đã được lọc vô trùng của chúng. Chế phẩm pha tiêm sẽ được xử lý,

nhồi vào vật chứa như ống tiêm, túi, chai, bơm tiêm hoặc lọ, và hàn kín trong điều kiện vô khuẩn theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hơn nữa, dược phẩm có thể được đóng gói và lưu hành ở dạng bộ kit được đề cập trong Loạt đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 09/259,337. Các thiết bị này sẽ có nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng đi kèm với dược phẩm hữu dụng trong quá trình điều trị đối tượng bị, hoặc có nguy cơ bị bệnh hoặc rối loạn.

Dạng bào chế dùng ngoài đường tiêu hóa có thể là liều tiêm duy nhất, dược phẩm truyền hoặc liều tiêm với liều lượng duy trì. Dược phẩm có thể được sử dụng trong một giai đoạn cố định hoặc thay đổi, *chẳng hạn*, một lần trong một ngày, hoặc theo “nhu cầu”.

Một số dược phẩm được sử dụng theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường miệng ở dạng liều được chấp nhận bao gồm, *chẳng hạn*, viên nang, viên nén, hỗn dịch hoặc dung dịch lỏng. Một số dược phẩm cũng có thể được sử dụng qua đường mũi hoặc xông hít. Dược phẩm có thể được tạo ra ở dạng dung dịch trong muối sinh lý, sử dụng benzyl ancol hoặc chất bảo quản thích hợp khác, chất kích thích hấp thu để gia tăng sinh khả dụng, và/hoặc các chất hòa tan hoặc phân tán thường quy khác.

Lượng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, có thể kết hợp được với chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi phụ thuộc vào đối tượng được điều trị và phương pháp sử dụng cụ thể. Dược phẩm có thể được sử dụng ở dạng liều đơn, nhiều liều hoặc trong một giai đoạn ở dạng dịch truyền. Chế độ liều cũng có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (*chẳng hạn*, đáp ứng điều trị hoặc điều trị dự phòng).

Theo phạm vi của sáng chế, kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được sử dụng cho người hoặc động vật theo phương pháp điều trị nêu trên ở lượng đủ để tạo ra tác dụng điều trị. Kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được sử dụng cho người hoặc động vật khác ở dạng liều thường quy bằng cách kết hợp kháng thể theo sáng chế với chất mang được dụng hoặc chất pha loãng được dụng theo kỹ thuật đã biết. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ

thuật này có thể nhận ra rằng dạng và đặc điểm của chất mang hoặc chất pha loãng được dụng sẽ được quy định bởi lượng hoạt chất, đường dùng và các thông số đã biết khác. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng sẽ nhận ra rằng hỗn hợp bao gồm một hoặc nhiều loại phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế có thể có hiệu quả.

Thuật ngữ “lượng hoặc liều có hiệu quả điều trị” hoặc “lượng có hiệu quả” là lượng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, khi được sử dụng sẽ tạo ra đáp ứng điều trị dương tính trong quá trình điều trị bệnh nhân bị bệnh cần điều trị.

Liều có hiệu quả điều trị của dược phẩm theo sáng chế, để điều trị bệnh do tế bào biểu hiện CD100 gây ra như một số loại ung thư, *chẳng hạn*, vùng đầu và cổ, tuyến tiền liệt, đại tràng, vú, và phổi ung thư; bệnh tự miễn, *chẳng hạn*, viêm khớp, xơ cứng rải rác, bệnh viêm bao gồm hệ thần kinh trung ương (CNS) và hệ thần kinh ngoại biên (PNS) bệnh viêm; và tạo mạch xâm nhập, thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm phương pháp sử dụng, vị trí đích, tình trạng sinh lý của bệnh nhân, bệnh nhân là người hay động vật, các thuốc khác được sử dụng, và liệu điều trị là điều trị dự phòng hay điều trị. Thông thường, bệnh nhân là người, động vật có vú không phải người bao gồm động vật có vú chuyển gen cũng có thể được điều trị. Liều điều trị có thể được xác định sử dụng phương pháp thường quy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tối ưu độ an toàn và hiệu quả của dược phẩm.

Lượng của ít nhất một phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, được sử dụng có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này mà không cần một thử nghiệm không cần thiết nào theo sáng chế. Yếu tố ảnh hưởng đến phương pháp sử dụng và lượng tương ứng của ít nhất một phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mức độ nghiêm trọng của bệnh, tiền sử bệnh, và tuổi, chiều cao, thể trọng, sức khỏe, và tình trạng sinh lý của bệnh nhân trong điều trị. Tương tự, lượng phân tử liên kết kháng

CD100, *chẳng hạn*, kháng thể, hoặc mảnh, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, được sử dụng sẽ phụ thuộc vào phương pháp sử dụng và liệu bệnh nhân có được điều trị bằng một liệu duy nhất hay nhiều liệu.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, trong sản xuất được phẩm để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, bao gồm, *chẳng hạn*, viêm khớp, xơ cứng rải rác, CNS và PNS bệnh viêm, hoặc ung thư.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, trong sản xuất được phẩm để điều trị đối tượng bị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, hoặc điều trị a ung thư, trong đó được phẩm được sử dụng ở đối tượng đã được điều trị từ trước bằng ít nhất một chất trị liệu khác. Thuật ngữ “được điều trị trước” hoặc “điều trị trước” có nghĩa là đối tượng đã được điều trị bằng một hoặc nhiều liệu pháp khác (*chẳng hạn*, được điều trị bằng ít nhất một liệu pháp ung thư khác) trước được điều trị bằng được phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó. Thuật ngữ “được điều trị trước” hoặc “điều trị trước” chỉ đối tượng đã được điều trị bằng ít nhất một liệu pháp khác trong vòng 2 năm, trong vòng 18 tháng, trong vòng 1 năm, trong vòng 6 tháng, trong vòng 2 tháng, trong vòng 6 tuần, trong vòng 1 tháng, trong vòng 4 tuần, trong vòng 3 tuần, trong vòng 2 tuần, trong vòng 1 tuần, trong vòng 6 ngày, trong vòng 5 ngày, trong vòng 4 ngày, trong vòng 3 ngày, trong vòng 2 ngày, hoặc thậm chí là trong vòng 1 day trước bắt đầu điều trị bằng được phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể đơn dòng 2503 được đề cập trong bản mô tả này, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó. Không cần thiết rằng bệnh nhân phải có đáp ứng với quá trình điều trị trước đó. Do đó, bệnh nhân được điều trị bằng được phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể có đáp ứng, hoặc không đáp ứng (*chẳng hạn*, tình trạng ung thư không điều trị được), với phương pháp điều trị trước đó, hoặc với một hoặc nhiều phương pháp điều trị trước đó khi quá trình điều trị trước bao gồm nhiều liệu pháp. Ví dụ về liệu

pháp ung thư khác đối tượng có thể được điều trị trước khi được điều trị bằng dược phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng CD100, *chẳng hạn*, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phẫu thuật; xạ trị; hóa trị liệu, tùy ý cùng với ghép tủy xương tự sinh, trong đó chất hóa trị liệu thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hóa chất được nêu trong bản mô tả này; liệu pháp kháng thể đơn dòng kháng ung thư; liệu pháp ung thư dựa trên phân tử nhỏ khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử được nêu trên; liệu pháp ung thư dựa trên vaccin/miễn dịch; liệu pháp steroid; liệu pháp ung thư khác; hoặc hỗn hợp của chúng.

IX. Chẩn đoán

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp chẩn đoán hữu dụng trong chẩn đoán bệnh do tế bào biểu hiện CD100 gây ra như một số loại ung thư, bệnh tự miễn, bệnh viêm bao gồm, *chẳng hạn*, viêm khớp, xơ cứng rải rác, hệ thần kinh trung ương (CNS) và hệ thần kinh ngoại biên (PNS) bệnh viêm, và tạo mạch xâm nhập, bao gồm việc xác định mức độ biểu hiện của protein CD100 hoặc bản sao phiên mã trong mô hoặc tế bào hoặc dịch cơ thể của đối tượng và so sánh mức độ biểu hiện đo được với mức độ biểu hiện CD100 chuẩn trong mô hoặc dịch cơ thể bình thường, do đó sự gia tăng mức độ biểu hiện so với mẫu chuẩn sẽ là chỉ thị của rối loạn.

Kháng thể kháng CD100 theo sáng chế và mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, và dẫn xuất của nó, có thể được sử dụng để thử nghiệm nồng độ protein CD100 trong mẫu sinh học sử dụng phương pháp hóa mô miễn dịch cổ điển đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (*chẳng hạn*, see Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Các phương pháp dựa trên kháng thể khác hữu trong để phát hiện quá trình biểu hiện protein CD100 bao gồm thử nghiệm miễn dịch, như thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), kết tủa miễn dịch, hoặc thẩm tách Western. Thử nghiệm thích hợp được đề cập chi tiết trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “thử nghiệm mức độ biểu hiện của polypeptit CD100” có nghĩa là xác định một cách định tính hoặc định lượng hoặc ước tính nồng độ của polypeptit

CD100 trong mẫu sinh học thứ nhất trực tiếp (*chẳng hạn*, bằng cách xác định hoặc ước tính nồng độ protein tuyệt đối) hoặc một cách tương đối (*chẳng hạn*, bằng cách so sánh với nồng độ polypeptit của bệnh trong mẫu sinh học thứ hai). Tốt hơn, nếu mức độ biểu hiện polypeptit CD100 trong mẫu sinh học thứ nhất được xác định hoặc ước tính và so sánh với nồng độ polypeptit CD100 chuẩn, giá trị chuẩn được xác định từ mẫu sinh học thứ hai thu được từ đối tượng không có the rối loạn hoặc được xác định bằng cách tính nồng độ trung bình của nhóm đối tượng không bị rối loạn. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, khi đã biết nồng độ polypeptit CD100 “chuẩn có thể sử dụng lặp lại giá trị này làm giá trị chuẩn để so sánh.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” là mẫu sinh học bất kỳ thu được từ đối tượng, dòng tế bào, mô nuôi cấy hoặc các nguồn tế bào khác biểu hiện CD100. Phương pháp thu được mẫu sinh thiết mô và dịch cơ thể từ động vật có vú đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

X. Thử nghiệm miễn dịch

Kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được thử nghiệm mức độ liên kết đặc hiệu miễn dịch bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thử nghiệm miễn dịch có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở thử nghiệm cạnh tranh hoặc không cạnh tranh sử dụng kỹ thuật như thẩm tách Westerns, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA (thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym), thử nghiệm miễn dịch “sandwich”, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, phản ứng precipitin, phản ứng precipitin khuếch tán vào gel, thử nghiệm khuếch tán miễn dịch, thử nghiệm agglutinin hóa, thử nghiệm cố định bổ thể, thử nghiệm đo mức độ phóng xạ miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch protein A. Thử nghiệm nói trên là thường quy và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (tham khảo, chẳng hạn, Ausubel *et al.*, eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1). Một số thử nghiệm miễn dịch sẽ được đề cập vắn tắt dưới đây.

Kết tủa miễn dịch thường bao gồm bước pghaan giải một số tế bào trong đệm phân giải như RIPA (1% NP-40 hoặc Triton X-100, 1% natri deoxycholat, 0,1% SDS,

0,15M NaCl, 0,01M natri phosphat ở pH 7,2, 1% Trasyllol) được bổ sung chất ức chế protein phosphatase và/hoặc protease (*chẳng hạn*, EDTA, PMSF, aprotinin, natri vanadate), thêm kháng thể cần quan tâm vào dịch phân giải tế bào, ủ trong một khoảng thời gian (*chẳng hạn*, 1 đến 4 giờ) ở 4°C, thêm hạt sepharose protein A và/hoặc protein G vào dịch phân giải tế bào, ủ trong khoảng một giờ hoặc nhiều hơn ở 4°C, rửa hạt trong đệm phân giải và tái phân tán hạt trong đệm SDS/mẫu. Khả năng gây kết tủa miễn dịch của kháng thể với một kháng nguyên cụ thể có thể đánh giá bằng, *chẳng hạn*, phân tích thẩm tách western. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận biết được thông số nào cần biến đổi để gia tăng mức độ liên kết của kháng thể với kháng nguyên và giảm yếu tố gây nhiễu của môi trường (*chẳng hạn*, làm trong sơ bộ dịch phân giải tế bào bằng hạt sepharose). Để tham khảo chi tiết hơn về quy trình kết tủa miễn dịch tham khảo, *chẳng hạn*, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 at 10,16,1.

Thẩm tách Western thường bao gồm bước chuẩn bị mẫu protein, điện di mẫu protein trên gel polyacrylamit (*chẳng hạn*, 8%-20% SDS-PAGE phụ thuộc vào trọng lượng phân tử của kháng nguyên), chuyển mẫu protein từ gel polyacrylamit sang màng như nitrocellulose, PVDF hoặc nylon, phong bế màng trong dung dịch phong bế (*chẳng hạn*, PBS với 3% BSA hoặc sữa không béo), rửa màng trong đệm rửa (*chẳng hạn*, PBS-Tween 20), phong bế màng bằng kháng thể thứ nhất (kháng thể cần quan tâm) được pha loãng trong đệm phong bế, rửa màng trong đệm rửa, phong bế màng bằng kháng thể thứ hai (có khả năng nhận diện kháng thể thứ nhất, *chẳng hạn*, kháng thể kháng người) được liên hợp với cơ chất enzym (*chẳng hạn*, horseradish peroxidase hoặc phosphatase kiềm) hoặc phân tử có hoạt tính phóng xạ (*chẳng hạn*, ^{32}P hoặc ^{125}I) được pha loãng trong đệm phong bế, rửa màng trong đệm, và phát hiện sự có mặt của kháng nguyên. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận biết được thông số nào cần biến đổi để gia tăng mức độ liên kết của kháng thể với kháng nguyên và giảm yếu tố gây nhiễu của môi trường. Để tham khảo chi tiết hơn về quy trình thẩm tách Western tham khảo, *chẳng hạn*, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 at 10,8,1.

ELISA bao gồm bước chuẩn bị kháng nguyên, phủ giếng trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng bằng kháng nguyên, thêm kháng thể cần quan tâm liên hợp với hợp chất có thể phát hiện được như cơ chất enzym (*chẳng hạn*, horseradish peroxidaza hoặc phosphatasa kiềm) vào giếng và ủ trong một khoảng thời gian, và phát hiện sự có mặt của kháng nguyên. Trong thử nghiệm ELISA, kháng thể cần quan tâm không cần phải liên hợp với hợp chất có thể phát hiện được; thay vào đó, là kháng thể thứ hai (có khả năng nhận diện kháng thể cần quan tâm) liên hợp với hợp chất có thể phát hiện được có thể được thêm vào giếng. Hơn nữa, thay vì phủ giếng bằng kháng nguyên, có thể phủ giếng bằng kháng thể. Trong trường hợp này, kháng thể thứ hai được liên hợp với hợp chất có khả năng phát hiện có thể được thêm vào sau khi thêm kháng nguyên cần quan tâm vào giếng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận biết được thông số nào cần biến đổi để gia tăng mức độ liên kết của kháng thể với kháng nguyên và giảm yếu tố gây nhiễu của môi trường. Để tham khảo chi tiết hơn về quy trình ELISA tham khảo, *chẳng hạn*, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 at 11,2,1.

Ái lực liên kết của kháng thể với kháng nguyên và tốc độ phân lý của tương tác kháng thể-kháng có thể được xác định bằng thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Ví dụ về thử nghiệm liên kết cạnh tranh là thử nghiệm phóng xạ miễn dịch bao gồm bước ủ kháng nguyên được đánh dấu (*chẳng hạn*, ^3H hoặc ^{125}I) với kháng thể cần quan tâm khi có sự gia tăng lượng kháng nguyên không được đánh dấu, và phát hiện kháng thể liên kết với kháng nguyên được đánh dấu. Ái lực của kháng thể cần quan tâm đối với một kháng nguyên cụ thể và tốc độ phân ly liên kết có thể được xác định từ kết quả của phân tích biểu đồ. Mức độ cạnh tranh với kháng thể thứ hai cũng có thể được xác định sử dụng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ. Trong trường hợp này, kháng nguyên sẽ được ủ với kháng thể cần quan tâm được liên hợp với hợp chất được đánh dấu (*chẳng hạn*, ^3H hoặc ^{125}I) khi có sự gia tăng lượng kháng thể thứ hai được đánh dấu.

Kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, ngoài ra, còn có thể được sử dụng trong mô học, như trong thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm hiển vi miễn dịch điện tích hoặc các thử nghiệm không miễn dịch, để phát hiện *in situ* protein CD100 hoặc biến thể hoặc

peptit bảo toàn của nó. Quá trình phát hiện *in situ* có thể được thực hiện bằng cách lấy mẫu mô từ bệnh nhân, và sử dụng kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất được đánh dấu của nó, thường là sử dụng kháng thể (hoặc mảnh) lên mẫu sinh học. Thông qua việc sử dụng quy trình này, không chỉ có thể đánh giá sự có mặt của protein CD100, hoặc biến thể bảo toàn hoặc peptit của nó, mà còn sự phân bố của chúng trong mẫu mô được thử nghiệm. Bằng cách sử dụng sáng chế, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể biến đổi nhiều phương pháp mô học (như phương pháp nhuộm) để có thể phát hiện *in situ* protein CD100.

Thử nghiệm miễn dịch và thử nghiệm không miễn dịch đối với sản phẩm của gen CD100 hoặc biến thể bảo toàn hoặc phân đoạn peptit của nó thường bao gồm bước ủ mẫu, như dịch sinh học, dịch chiết mô, tế bào mới được thu hoạch, hoặc dịch phân giải tế bào đã được ủ trong môi trường nuôi cấy, khi có kháng thể được đánh dấu phát hiện có khả năng liên kết với CD100 hoặc biến thể bảo toàn hoặc phân đoạn peptit của nó, và phát hiện kháng thể liên kết bằng một kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Mẫu sinh học có thể được cho tiếp xúc với và được cố định trên giá đỡ rắn hoặc chất mang như nitroxenluloza, hoặc giá đỡ rắn có khả năng cố định tế bào, tiểu phần tế bào hoặc protein hòa tan. Sau đó giá đỡ có thể được rửa bằng đệm thích hợp sau đó là xử lý bằng kháng thể được đánh dấu phóng xạ kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó. Sau đó giá đỡ rắn có thể được rửa bằng đệm lần thứ hai để loại bỏ kháng thể không liên kết. Tùy ý kháng thể sẽ được đánh dấu sau. Lượng chất đánh dấu liên kết trên giá đỡ rắn có thể được phát hiện bằng kỹ thuật thường quy.

Thuật ngữ “giá đỡ rắn hoặc chất mang” là giá đỡ bất kỳ có khả năng liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể. Giá đỡ hoặc chất mang đã biết bao gồm thủy tinh, polystyren, polypropylen, polyetylen, dextran, nylon, amylaza, xenluloza có nguồn gốc tự nhiên hoặc cải tiến, polyacrylamit, gabbro, và hạt từ tính. Chất mang có thể có tính tan ở một mức độ nào đó hoặc không tan theo sáng chế. Vật liệu giá đỡ có thể có cấu hình ảo hoặc thật miễn là phân tử liên kết với nó có khả năng liên kết với kháng

nguyên hoặc kháng thể. Do đó, giá đỡ có thể có cấu hình cầu, như ở dạng hạt, hoặc hình trụ, như trong bề mặt bên trong của ống nghiệm, hoặc mặt ngoài của que. Theo một cách khác, bề mặt có thể phẳng như tờ giấy, que thử, v.v.. Giá đỡ được ưu tiên bao gồm hạt polystyren. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết nhiều chất mang thích hợp khác để gắn kháng thể hoặc kháng nguyên, hoặc có thể tạo ra một số chất mang thích hợp bằng quá trình thử nghiệm.

Hoạt tính liên kết của kháng thể kháng CD100, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định điều kiện thử nghiệm tối ưu để đánh giá hoạt tính liên kết sử dụng các thử nghiệm thường quy.

Có rất nhiều phương pháp để xác định ái lực của tương tác kháng thể-kháng nguyên, nhưng chỉ có một số ít kỹ thuật để xác định hằng số tốc độ. Phần lớn các phương pháp trên phụ thuộc vào việc đánh dấu kháng thể hoặc kháng nguyên, điều này sẽ làm rắc rối các phương pháp thử nghiệm thường quy và tạo ra một số sai số trong phép đo định lượng.

Cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được thực hiện trên BIACORE® có một số ưu điểm so với phương pháp xác định ái lực của tương tác kháng thể-kháng nguyên thường quy: (i) không cần đánh dấu kháng thể hoặc kháng nguyên; (ii) kháng thể không cần phải tinh chế trước, dịch nổi nuôi cấy tế bào có thể được sử dụng trực tiếp; (iii) phép đo thời gian thực, cho phép so sánh định lượng nhanh các tương tác của kháng thể đơn dòng khác, là có thể và đầy đủ đối với nhiều mục tiêu đánh giá; (iv) bề mặt đặc hiệu sinh học có thể được tái tạo để một loạt các kháng thể đơn dòng khác có thể được so sánh trong các điều kiện giống nhau; (v) quy trình phân tích là hoàn toàn tự động, và một loạt các phép đo kéo dài có thể được thực hiện mà không cần sự can thiệp của người dùng. BIAapplications Handbook, version AB (reprinted 1998), BIACORE® code No. BR-1001-86; BIATECHNOLOGY Handbook, version AB (reprinted 1998), BIACORE® code No. BR-1001-84. Thử nghiệm liên kết dựa trên SPR cần một thành viên của cặp liên kết phải được cố định trên bề mặt cảm biến. Thành viên liên kết được cố định được gọi là the phối tử. Thành viên liên kết trong dung dịch được gọi

là chất phân tích. Trong một số trường hợp, phối tử sẽ được cố định một cách gián tiếp vào bề mặt thông qua liên kết với phân tử được cố định khác, được gọi là phân tử bất giữ. Đáp ứng SPR sẽ phản ánh sự thay đổi nồng độ khối tượng tại bề mặt phát hiện khi chất phân tích gắn vào và phân ly.

Dựa trên SPR, phép đo BIACORE® thời gian thực có thể theo dõi quá trình tương tác một cách trực tiếp khi chúng xảy ra. Kỹ thuật này là đặc biệt phù hợp với việc xác định các thông số động học. Việc phân hạng ái lực tương đương có thể được thực hiện một cách đơn giản, và cả hằng số động học và hằng số ái lực đều có thể thu được từ số liệu của cảm biến đồ.

Khi chất phân tích được tiêm vào một mạch riêng biệt ngang qua bề mặt phối tử, cảm biến đồ hình thành có thể được chia ra làm 3 giai đoạn chính: (i) quá trình kết hợp của chất phân tích với phối tử trong quá trình tiêm mẫu; (ii) cân bằng hoặc trạng thái ổn định trong quá trình tiêm mẫu, khi tốc độ liên kết với chất phân tích là cân bằng với tốc độ phân ly ra khỏi phức hệ; (iii) sự phân ly của chất phân tích ra khỏi bề mặt trong dòng chảy dung dịch đệm.

Pha kết hợp và phân ly sẽ cung cấp thông tin về động học của tương tác chất phân tích-phối tử (k_a và k_d , tốc độ của quá trình hình thành và phân ly phức hệ, $k_d/k_a=K_D$). Pha cân bằng sẽ cung cấp thông tin về ái lực của tương tác chất phân tích-phối tử (K_D).

Phân mềm BIAevaluation sẽ cung cấp đầy đủ công cụ vẽ đường cong thực nghiệm sử dụng cả thuật toán tích phân số học và vẽ đường cong thực nghiệm toàn cục. Bằng các phân tích số liệu thích hợp, hằng số tốc độ phân ly và ái lực đối với một tương tác có thể thu được từ các khảo sát BIACORE® đơn giản. Khoảng ái lực đo được bằng kỹ thuật này là một khoảng rất rộng từ mM đến pM.

Độ đặc hiệu epitop là một đặc tính quan trọng của kháng thể đơn dòng. Lập bản đồ epitop bằng BIACORE®, ngược với các kỹ thuật thường quy sử dụng thử nghiệm phóng xạ miễn dịch, ELISA hoặc các phương pháp hấp phụ bề mặt khác, không cần đánh dấu hoặc tinh chế kháng thể, và cho phép nhiều thử nghiệm độ đặc hiệu tại nhiều

vị trí sử dụng trình tự của vài kháng thể đơn dòng. Ngoài ra, một số lượng lớn phân tích có thể được xử lý tự động.

Thử nghiệm liên kết cặp đôi sẽ thử nghiệm khả năng của hai Mab liên kết đồng thời với cùng một kháng nguyên. Mab kháng các epitop riêng biệt sẽ liên kết một cách độc lập, trong khi đó Mab kháng lại các epitop giống nhau hoặc có liên quan với nhau sẽ ảnh hưởng đến mức độ liên kết của nhau. Các thử nghiệm liên kết này bằng BIACORE® có thể được tiến hành một cách dễ dàng.

Chẳng hạn, có thể sử dụng phân tử bắt giữ để liên kết với Mab thứ nhất, sau đó là thêm kháng nguyên và MAb thứ hai vào. Cảm biến đồ sẽ chỉ ra: (1) bao nhiêu kháng nguyên liên kết với Mab thứ nhất, (2) MAb thứ hai liên kết với kháng nguyên được gắn lên bề mặt ở mức độ nào, (3) nếu MAb không liên kết, liệu trình tự thử nghiệm ngược lại có làm thay đổi kết quả hay không.

Ức chế peptit là một kỹ thuật khác được sử dụng để lập bản đồ epitop. Phương pháp này có thể hỗ trợ cho phương pháp liên kết kháng thể cặp đôi, và có thể đưa ra sự liên quan của epitop chức năng với đặc điểm cấu trúc khi đã biết trình tự sơ cấp của kháng nguyên. Peptit hoặc kháng nguyên sẽ thử nghiệm ức chế liên kết với các Mab khác nhau với kháng nguyên được cố định. Peptit ảnh hưởng đến quá trình liên kết của một Mab nhất định sẽ được cho là có sự liên quan về mặt cấu trúc với epitop được xác định bằng Mab đó.

Kỹ thuật theo sáng chế sẽ sử dụng, trừ khi có quy định khác, kỹ thuật thường quy trong sinh học tế bào, nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử, sinh học chuyển gen, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, và miễn dịch học, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật nói trên được mô tả đầy đủ trong nhiều tài liệu. Tham khảo, chẳng hạn, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *ADN Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotit Synthesis*; Mullis et al. Patent Mỹ số 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acids Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription and Translation*;

Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methodology In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vector For Mammalian Cell*. (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methodology In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Method In Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); and in Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley và Sons, Baltimore, Md.).

Nguyên tắc chung của việc biến đổi kháng thể được đề cập trong Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Nguyên tắc chung của việc biến đổi protein được đề cập trong Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Nguyên tắc chung của kháng thể and phân tử liên kết kháng thể được thể hiện trên: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); and Steward (1984) *Antibody, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Ngoài ra, phương pháp chuẩn trong miễn dịch đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này and không được mô tả cụ thể trong *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) and Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Method in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

Tài liệu về nguyên tắc chung của miễn dịch học bao gồm *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibodies Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden et al.,

(Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) *Kuby Immunology* (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) *Immunology* (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) *Antibody: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

Tất cả các tài liệu viện dẫn ở trên cũng như tất cả các tài liệu được viện dẫn trong bản mô tả này đều được đưa vào đây ở dạng tài liệu tham khảo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra với mục đích minh họa rõ hơn sáng chế và không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1 Chọn lọc và xác định đặc điểm của kháng thể đặc hiệu đối với CD100

Kháng thể kháng CD100 của chuột nhận diện được CD100 của người, của khỉ và của chuột và được tạo ra sử dụng phương pháp được mô tả dưới đây.

Dòng tế bào “Line 1” thu được từ khối u phổi tự phát ở chuột BALB/c. Tác giả sáng chế đã chỉ ra từ trước rằng việc tiêm chuột BALB/c bằng dòng tế bào Line 1 được chuyển nhiễm ADN bổ trợ ngoại lai là một cách hiệu quả để kích thích đáp ứng miễn dịch (unpublished data). Dòng tế bào Line 1 được chuyển nhiễm bằng plasmit biểu hiện chứa ADN bổ trợ mã hóa CD100 nguyên vẹn của người (SEQ ID NO: 23). Dòng biểu hiện ổn định CD100 của người được phân lập từ dòng tế bào được chuyển nhiễm (Line1.CD100). Chuột thiếu hụt CD100 (giống BALB/c, tham khảo Kumanogoh *et al.*, *J. Immunol.* 169:1175-1181 (2002)) được chủng ngừa mũi đầu với CD100 của chuột-His (vùng ngoại bào của CD100 của chuột với đuôi his 6X ở đầu C để tinh chế) được nhũ hóa trong tá được Freund hoàn chỉnh (CFA). Một tuần sau khi chủng ngừa, chuột được tiêm bắp (i.m.) 200000 tế bào Line1.CD100 sống. 19 ngày sau khi tiêm

Line1.CD100, chuột được giết và lách được thu lại và dung hợp với thể dung hợp P3X63Ag8,653 (ATCC# CRL-1580) theo quy trình chuẩn để tạo ra tế bào lai. Thể tách dòng tế bào lai được sàng lọc bằng ELISA khả năng liên kết với CD100 của người và của chuột. Cụ thể, dòng tế bào lai, đặc hiệu với MAb 67, được tạo ra sử dụng kỹ thuật tế bào lai (Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975); Kohler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976); Kohler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:292 (1976); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., pp. 571-681 (1981)). Một bảng lớn các kháng thể đặc hiệu với CD100 của chuột được tạo ra. Hầu hết các kháng thể cũng liên kết với ái lực cao với CD100 của người. Hai thể lai, thể tách dòng 67-2 và 76-1, tạo ra kháng thể đơn dòng (gọi là MAb 67 và MAb 76) có ái lực cao đối với cả CD100 của chuột và CD100 của người (xem bảng 2).

Bảng 2. Thông số ái lực đối với MAb kháng CD100 của chuột

<u>MAb</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Ái lực đối với CD100 của chuột (nM)*</u>	<u>Ái lực đối với CD100 của người (nM)*</u>
67	IgG1	1,00	5,7
76	IgG2b	0.33	0,12

* Ái lực được đo bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®

Thử nghiệm ELISA liên kết chéo kháng thể đã chứng tỏ rằng MAb 67 và MAb 76 nhận diện các epitop khác nhau trên CD100. Ngoài ra, MAb 67 và 76 còn nhận diện epitop khác với epitop được nhận diện bởi kháng thể BD16 của chuột kháng CD100 của người thu được một cách độc lập (được đề cập trong US 2008/0219971 A1). Do đó, đã tạo ra được hai kháng thể kháng CD100 độc lập của chuột, MAb 76 (SEQ ID NO: 25-40) và MAb 67 (SEQ ID NO: 3-8; 10; 11-16; 18; 20 và 22).

Ví dụ 2 MAb 67 và 76 chặn hoạt tính của CD100 của chuột và của người *in vitro*

Kháng thể đặc hiệu với CD100 được sàng lọc khả năng ức chế quá trình liên kết của CD100 trong thử nghiệm chặn phát huỳnh quang. Mô tả phương pháp được sử dụng để xác định liệu kháng thể đặc hiệu với CD100 có chặn CD100 liên kết với

Plexin B1 được thể hiện trên Fig. 1. Tế bào 293 của người được chuyển nhiễm bằng ADN bổ trợ mã hóa thụ thể CD100: Plexin B1. Dòng tế bào ổn định biểu hiện Plexin B1 được chọn (293/Plexin). CD100-His gắn với Plexin B1 trên bề mặt tế bào được phát hiện bằng phương pháp đo dòng chảy tế bào sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu His tag được gắn biotin và streptavidin-APC. Khi MAb kháng CD100 thử nghiệm có khả năng chặn quá trình liên kết của CD100 với Plexin B1, thì ít CD100-His hơn sẽ được phát hiện trên tế bào, tạo ra mức độ phát huỳnh quang thấp hơn.

40ng CD100 của chuột hoặc của người-His (His tag ở đầu C) được ủ riêng biệt hoặc cùng với MAb kháng CD100 ở các nồng độ khác nhau qua đêm ở 4°C. Sáng hôm sau, (1) chỉ CD100 hoặc (2) CD100 được ủ trước cùng với MAb kháng CD100 (67 hoặc 76) được tổ hợp với tế bào 293/Plexin và ủ trong 30 phút trên băng. CD100 liên kết với tế bào thông qua Plexin B1 được phát hiện sử dụng MAb kháng his đa dòng của thỏ được biotin hóa, sau đó là streptavidin-APC, và tế bào được phân tích bằng phương pháp đo dòng chảy tế bào. Kết quả chỉ ra rằng quá trình trung hòa CD100 tạo ra mức độ phát huỳnh quang thấp hơn. Cụ thể, CD100 được ủ trước bằng MAb 67 hoặc MAb 76 tạo ra mức độ phát huỳnh quang thấp hơn so với CD100 riêng biệt (Fig. 2). Việc gia tăng nồng độ của MAb kháng CD100 67 hoặc 76 từ 0,156µg/ml lên 0,625µg/ml tạo ra sự giảm mức độ huỳnh quang tiếp theo. Hiện tượng chặn CD100 của người tương tự cũng được phát hiện (không nêu số liệu). Do đó, kết quả này chỉ ra rằng MAb 67 và MAb 76 đều có khả năng chặn quá trình liên kết của CD100 của người và của chuột với Plexin B1.

Quá trình truyền tín hiệu CD100/Plexin B1 đã được chỉ ra là có khả năng kích thích sự tách chất nền ngoại bào và quá trình suy giảm tế bào bằng cách kích thích quá trình tái sắp xếp sợi actin (*See Kruger et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:789-800 (2005)). Một thử nghiệm khác để đánh giá mức độ tách tế bào sau khi liên kết với chất nền ngoại bào được sử dụng để đánh giá liệu kháng thể kháng CD100 có thể chặn quá trình tách tế bào 293/Plexin được kích thích bởi CD100 ra khỏi đĩa được phủ Fibronectin hay không.

Để thực hiện thử nghiệm tách tế bào, tế bào 293/plexin (thường sinh trưởng thành dịch huyền phù dòng tế bào) được cấy lên đĩa ở mật độ 40000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng được phủ fibronectin và để dính qua đêm. Hai (2) $\mu\text{g/ml}$ CD100 của chuột-His (His tag đầu C) được ủ riêng biệt hoặc cùng với nồng độ khác nhau MAb kháng CD100 (67 hoặc 76) trong 6 giờ ở 4°C. Mẫu CD100 được để đến nhiệt độ phòng trước khi bổ sung tế bào 293/plexin. Tế bào được xử lý bằng CD100 hoặc CD100 được ủ trước bằng kháng thể trong 30 phút ở 37°C, được rửa hai lần bằng PBS, và nhuộm với tím tinh thể trong 15 phút. Sau đó, tế bào được rửa hai lần bằng PBS và làm khô. Ảnh được chụp trên máy quét để lưu lại. Sau đó, tím tinh thể được hòa tan trong 15 phút ở RT bằng 100 μl axit axetic lạnh 33%, và được chuyển sang một đĩa mới. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 570nm. CD100 gây ra sự giảm số lượng tế bào dính với đĩa, và do đó sẽ làm giảm độ hấp thụ, trong khi đó quá trình trung hòa CD100 sẽ làm tăng độ hấp thụ.

Như được thể hiện trên Fig. 3, cả MAb 67 và MAb 76 đều có khả năng chặn quá trình tách tế bào do CD100 của chuột gây ra và làm tăng độ hấp thụ so với đối chứng isotyp. Tương tự, cả hai MAb đều có thể chặn quá trình tách tế bào do CD100 của người gây ra (không nêu số liệu).

MAb 67 và 76 đều chặn quá trình liên kết của CD100 với Plexin B1 bề mặt tế bào và gây ra sự tách tế bào 293/Plexin ra khỏi đĩa được phủ Fibronectin. Kết quả của thử nghiệm chức năng *in vitro* nêu trên chỉ ra rằng MAb 67 và MAb 76 đều có khả năng chặn chức năng của CD100 của người và chuột *in vitro*.

Ví dụ 3 Đánh giá kháng thể đơn dòng kháng CD100 ở mẫu chuột bị bệnh

Kháng thể đơn dòng kháng CD100 (76 và 67) được thử nghiệm *in vivo* ở mẫu động vật SJL EAE. Viêm vỏ myelin não tự miễn suy giảm thực hiện (R-EAE) là bệnh do tế bào T CD4⁺ gây ra đặc trưng bởi viêm và quá trình khử myelin hóa trong hệ thần kinh trung ương. Ở chuột SJL, R-EAE có thể gây ra bằng cách chủng peptit epitop của protein proteolipit (PLP₁₃₉₋₁₅₁) (HSLGKWLGHDPKF; SEQ ID NO: 24). Mẫu được này đặc trưng bởi giai đoạn liệt cấp tính vừa phải đến nghiêm trọng sau đó là thoái lui

và trở nặng. Mức độ nghiêm trọng của bệnh được đánh giá sử dụng thang điểm trong bảng 3.

Bảng 3. Đánh giá dấu hiệu lâm sàng của EAE

Điểm số	Dấu hiệu	Mô tả
0	Hành vi bình thường	Không có dấu hiệu thần kinh
1	Yếu phần dưới đuôi	Phần dưới của đuôi yếu và phù
1,5	Yếu đuôi toàn bộ	Toàn bộ đuôi mềm và phù
2	Phản xạ điều tiết	Động vật khó cuộn tròn chân khi nằm ngửa
3	Mất điều hòa	Đi lảo đảo –khi chuột đi chân sau không ổn định
4	Liệt sớm	Chuột khó có thể đứng bằng chân sau nhưng vẫn còn có chuyển động
5	Liệt hoàn toàn	Chuột không thể di chuyển chân, gầy hơn và hóc hác
6	Hấp hối/Tử vong	Tử vong

Chuột SJL được chủng ngừa bằng 100 μ g PLP₁₃₉₋₁₅₁ in CFA. Độc tố ho gà được sử dụng vào 0 và một lần nữa 48 giờ sau đó. Chuột được điều trị bằng 30mg/kg kháng thể MAb 76, 67 hoặc isotyp đối chứng hai lần trong một tuần bắt đầu vào ngày thứ 0, hoặc một lần một tuần bắt đầu vào ngày 7. Đánh giá dấu hiệu lâm sàng EAE được bắt đầu từ 10 sau khi gây bệnh EAE.

Như được thể hiện trên Fig. 4A, điều trị bằng MAb 76 hoặc MAb 67 giảm mức độ nghiêm trọng của EAE ở chuột SJL so với IgG đối chứng của chuột. Tỷ lệ giảm trong điểm số trung bình của nhóm (GMS) từ ngày 21 cho đến khi kết thúc nghiên cứu đối với MAb 76 và 67 1X/tuần và 2x/tuần được thể hiện trên Fig. 4B. Như được thể hiện trên Fig. 4B, MAb 76 (1X/tuần) có tỷ lệ ức chế GMS là 35 đến 40%; MAb 67 (1X/tuần) có tỷ lệ ức chế GMS là 65 đến 70%; MAb 76 (2X/tuần) có tỷ lệ ức chế GMS là 40 đến 50%; và MAb 67 (2X/tuần) có tỷ lệ ức chế GMS là 45 đến 50%. Kết quả này chỉ ra rằng cả MAb 67 và MAb 76 đều làm giảm ức độ EAE thoái lui-trở nặng ở chuột SJL.

Thử nghiệm SJL EAE được lặp lại sử dụng MAb 76 với liều 30mg/kg và chế độ liều 1X/tuần. Kết quả chứng tỏ rằng MAb 76 có khả năng giảm mức độ nghiêm trọng của EAE ở chuột SJL so với IgG của chuột (không nêu số liệu). Tỷ lệ giảm trong điểm số trung bình của nhóm (GMS) từ ngày 21 cho đến khi kết thúc nghiên cứu là từ 50-60%. Hơn nữa, thử nghiệm SJL EAE được lặp lại sử dụng MAb 76 hoặc MAb 67 với liều 30mg/kg và chế độ liều 1X/tuần. Điều trị bằng MAb 67 hoặc MAb 76 gây ra tỷ lệ giảm GMS là từ 30 đến 40% từ ngày 18 đến khi kết thúc thử nghiệm. Kết quả trên Fig. 5A và 5B chứng tỏ rằng MAb 76 và MAb 67 có khả năng giảm mức độ nghiêm trọng của EAE ở chuột SJL.

Thử nghiệm SJL EAE được lặp lại sử dụng MAb 67 với liều 30mg/kg và chế độ liều 1X/tuần trong đó điều trị bắt đầu vào ngày 7 sau khi chủng. Điều trị bằng MAb 67 bắt đầu từ ngày 7 tạo ra tỷ lệ giảm GMS khoảng 50% từ ngày 12 đến khi kết thúc thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trên Fig. 6.

Kết quả từ các thử nghiệm *in vivo* chứng minh rằng quá trình trung hòa CD100 sử dụng MAb 76 hoặc MAb 67 đã làm giảm dấu hiệu lâm sàng của EAE trong ác thử nghiệm EAE ở chuột khác nhau. Kết quả đối với MAb 76 và MAb 67 là tương tự với một thử nghiệm khác trong số các thử nghiệm này.

Kết quả nói trên chứng minh rằng MAb 76 và MAb 67 có khả năng chặn hoạt tính CD100 *in vitro*, và, quan trọng là, khả năng làm giảm mức độ nghiêm trọng của EAE với các chế độ liều khác nhau ở mẫu chuột EAE.

Ví dụ 4: Tạo kháng thể khảm và kháng thể được làm cho có tính chất giống người đơn dòng kháng CD100

Thể tách dòng kháng thể đơn dòng 67 của chuột, nêu trên, đã được chỉ ra là có khả năng trung hòa cả CD100 của người và của chuột *in vitro* và giảm EAE ở mẫu chuột *in vivo*.

Gen vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VK) được tách dòng từ thể tác dòng tế bào lai 67 và được xác định trình tự. Trình tự axit amin của

gem VH và VK MAb 67 được thể hiện dưới đây với các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 được gạch chân.

MAb 67 VH:

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYYMHWVKQSPENSLEWI
GQINPTTGGASYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEESAVYYCTRY
YGRHFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)

MAb 67 VK:

DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPP
KLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTF
GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)

Gen VH MAb 67 được tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú chứa trình tự mã hóa vùng cố định chuỗi nặng gamma 4 của người, tạo ra chuỗi nặng khảm nguyên vẹn. MAb 67 VK được tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú có trình tự mã hóa vùng cố định Kappa của người, tạo ra chuỗi nhẹ khảm nguyên vẹn. Để tạo ra kháng thể khảm, vector biểu hiện chứa chuỗi nặng khảm và chuỗi nhẹ khảm được đồng biến nạp vào tế bào CHO-S. Kháng thể đơn dòng được tạo ra được tiết từ tế bào và thu hoạch sau 3 đến 6 ngày. MAb hình thành được tinh chế sử dụng sắc ký Protein A và được xác định đặc điểm. MAb khảm hình thành (MAb 2368) được chứng minh là đặc hiệu với CD100 bằng phương pháp đo dòng chảy tế bào và ELISA, và được chỉ ra là có khả năng cạnh tranh với MAb 67 của chuột trong liên kết với CD100. Nói chung, số liệu trên chứng tỏ rằng đã phân lập được chính xác gen VH và VK mã hóa MAb 67.

CDR vùng biến đổi của MAb 67 được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng được làm cho có tính chất giống người. Gen VH và VK được làm cho có tính chất giống người được tách dòng lần lượt vào vector chứa vùng cố định gamma 4 và kappa của người. Quá trình kết cặp của VH được làm cho có tính chất giống người và VK được làm cho có tính chất giống người tạo ra IgG4/kappa MAb 2503. Trình tự axit

amin của VH (H2160) và VK (L553) của MAb 67 được làm cho có tính chất giống người được thể hiện dưới đây với các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 được gạch chân.

Trình tự của H2160:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFSDYYMHVWRQAPGQGLE
WMGQINPTTGGASYNQKFKGKATITVDKSTSTAYMELSSLRSED~~TA~~VYYCAR
YYYGRHFDVWGQGT~~TV~~TVSS (SEQ ID NO: 9)

Trình tự của L553:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSV~~DY~~DGDSYMNWYQQKPGQPP
KLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTF
GQGTKLEIK (SEQ ID NO: 17)

Polynucleotit mã hóa VH (gen globulin miễn dịch của người với gamma của người; H2160) và VK (gen globulin miễn dịch của người với kappa của người; L553) của MAb 2503 được tách dòng vào vector pCMV-Script (Stratagene) và được lưu trữ trong American Type Culture Collection ("ATCC") vào ngày 07/05/2009, và được cấp số lưu trữ ATCC là PTA-10004 và PTA-10005. ATCC được đặt tại 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. Thử lưu trữ trong ATCC được tuân theo đúng điều khoản của hiệp ước Budapest đối với sự công nhận quốc tế về lưu trữ vi sinh vật mới mục đích patent.

Ví dụ 5: Xác định đặc điểm của kháng thể được làm cho có tính chất giống người đơn dòng kháng CD100 2503

Độ đặc hiệu của MAb 2503 được xác định bằng ELISA và phương pháp đo dòng chảy tế bào. MAb 2503 được thử nghiệm trong thử nghiệm cạnh tranh epitop với MAb 67 và thử nghiệm xác định ái lực sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®.

Độ đặc hiệu epitop của MAb 2503 và MAb 67 được xác định bằng ELISA cạnh tranh. Để tiến hành ELISA, đĩa ELISA được phủ CD100-Fc. MAb 67 hoặc được làm

cho có tính chất giống người 2503 của chuột được chuẩn độ. Kháng thể được để liên kết với CD100 và kháng thể không liên kết được rửa bỏ. MAb 67 đã biotin hóa được thêm vào. Kháng thể được để liên kết với CD100 và kháng thể không liên kết được rửa bỏ. MAb 67 biotin hóa liên kết với CD100 được phát hiện sử dụng Streptavidin-HRP. Khả năng của MAb 2503 hoặc MAb 67 chặn quá trình liên kết của 67 biotin hóa với CD100 của người (được thể hiện trên Fig. 7A) và CD100 của chuột (được thể hiện trên Fig. 7B) được phân tích bằng ELISA.

Ái lực liên kết của MAb kháng CD100 được xác định sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®. MAb 2503 được chỉ ra là chỉ liên kết với CD100 (người, chuột và khỉ đuôi sóc) và dòng tế bào biểu hiện CD100, chỉ ra rằng MAb 2503 là đặc hiệu với CD100. MAb 2503 cho thấy ái lực đối với CD100 của người và của chuột gia tăng so với MAb 67. Vắn tắt về đặc điểm ái lực của MAb 2503 và MAb 67 được nêu trong bảng 4.

Bảng 4. Ái lực của MAb kháng CD100 của người, khỉ đuôi sóc và của chuột

MAb	Ái lực đối với CD100 của người (nM)*	Ái lực đối với CD100 của khỉ đuôi sóc (nM)*	Ái lực đối với CD100 của chuột (nM)*
67	5,1	2,7	1,3
2503	5,4	2,4	1,5

* Ái lực được xác định sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®

Thử nghiệm này chỉ ra rằng MAb 2503 là đặc hiệu với CD100 và liên kết với cùng epitop như MAb 67 của chuột. MAb 2503 được chỉ ra là liên kết với cả CD100 của người và chuột, do đó một ưu điểm của MAb 2503 là có thể thử nghiệm độ an toàn và hiệu quả ở chuột và cũng như ở người. Hơn nữa, đã được chỉ ra rằng MAb 2305 liên kết với CD100 của người, khỉ, và chuột.

Ví dụ 6: MAb 2503 chặn hoạt tính của CD100 của người và chuột *in vitro*

MAb 2503 được xác định khả năng chặn chức năng của CD100 sử dụng thử nghiệm nêu trong Ví dụ 2, bao gồm (1) phương pháp đo dòng chảy tế bào và (2) thử nghiệm tách tế bào.

Kháng thể đặc hiệu với CD100, MAb 67 và MAb 2503, được sàng lọc khả năng ức chế quá trình liên kết của CD100 với Plexin B1 trong thử nghiệm chặn phát huỳnh quang. Phương pháp được sử dụng để thử nghiệm liệu kháng thể đặc hiệu với CD100 có thể ngăn chặn quá trình liên kết của CD100 với Plexin B1 hay không được thể hiện trên Fig. 1 (Ví dụ 2). CD100 đã ủ với MAb 67 hoặc MAb 2503 cho thấy mức độ phát huỳnh quang thấp hơn so với CD100. MAb 2503 có khả năng chặn quá trình liên kết của CD100 của người (Fig. 8A), khỉ đuôi sóc (Fig. 8B) và chuột (Fig. 8C) *in vitro*. Do đó, kết quả này chỉ ra rằng MAb 67 và MAb 2503 đều có khả năng chặn quá trình liên kết của CD100 của người, khỉ và chuột với Plexin B1.

Khả năng chặn quá trình tách ra khỏi đĩa được phủ fibronectin của tế bào B 293/Plexin được kích thích bởi CD100 của người và khỉ của MAb kháng CD100 được đánh giá sử dụng thử nghiệm tách tế bào được đề cập trong Ví dụ 2. CD100 gây ra sự giảm số lượng tế bào dính vào đĩa, và do đó sẽ làm giảm độ hấp thụ. Quá trình trung hòa CD100 của người và CD100 của khỉ đuôi sóc bằng MAb2503 hoặc MAb 67 gây ra sự gia tăng độ hấp thụ như được thể hiện trên Fig. 9A và 9B. MAb 2503 và MAb 67 cũng trung hòa CD100 của chuột trong thử nghiệm này (Không nêu số liệu).

MAb 2503 có khả năng chặn quá trình liên kết của CD100 của người, khỉ và chuột với bề mặt tế bào Plexin B1 và gây ra sự tách tế bào 293/Plexin khỏi đĩa được phủ Fibronectin. Do đó, kết quả này chỉ ra rằng MAb 2503 có khả năng trung hòa CD 100 của người, chuột và khỉ.

Ví dụ 7: Kháng thể kháng CD100 ức chế quá trình tạo mạch *in vivo*

CD100 là một phân tử tiền tạo mạch tiềm năng và quá trình hoạt hóa Plexin B1 qua liên kết với CD100 sẽ chuyển hoạt hóa c-Met và kích thích khả năng xâm nhập của tế bào ung thư và thúc đẩy quá trình tạo mạch.

Để chứng minh rằng tác dụng *in vivo* của hiện tượng không có CD100 lên quá trình sinh trưởng khối u, tế bào ung thư CT26 được tiêm vào cơ cẳng chân của chuột Balb/c kiểu dại hoặc chuột CD100^{-/-} và quá trình sinh trưởng khối u được xác định. Như được thể hiện trên Fig. 10, thể tích khối u ở chuột CD100^{-/-} bị giảm so với chuột Balb/c kiểu dại trong thử nghiệm này. Kết quả này chỉ ra rằng dòng tế bào ung thư đại tràng của chuột (CT26) đã làm giảm quá trình sinh trưởng trong môi trường thiếu CD100.

Tiếp theo, khả năng làm giảm quá trình sinh trưởng của tế bào ung thư CT26 ở chuột Balb/c kiểu dại của MAb 67 được thử nghiệm. Tế bào ung thư CT26 được tiêm vào cơ cẳng chân của chuột Balb/c (n =48) kiểu dại hoặc chuột CD100^{-/-} (n=9). Sau khi tiêm, chuột kiểu dại được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm 24 chuột. Một group được điều trị bắt đầu vào ngày thứ 1 bằng cách tiêm vào phúc mạc ổ bụng 1mg MAb 67, và nhóm còn lại được điều trị bằng cách tiêm phúc mạc ổ bụng 1mg IgG chuột. Điều trị được lặp lại sau mỗi 7 ngày. Chuột được phân tích quá trình sinh trưởng khối u. Như được thể hiện trên Fig. 11, điều trị bằng MAb 67 đã làm giảm quá trình sinh trưởng của khối u CT26 ở chuột Balb/c so với nhóm chứng IgG của chuột.

Do đó, kết quả này chỉ ra rằng kháng thể có đặc điểm về cấu trúc và chức năng của MAb 67 đã làm giảm sự sinh trưởng khối u *in vivo*.

Ví dụ 8: Kháng thể kháng CD100 ức chế viêm khớp do collagen *in vivo*

MAb 67 được thử nghiệm khả năng giảm viêm khớp ở mẫu chuột viêm khớp do collagen (CIA). Mẫu viêm khớp do collagen (CIA) là mẫu vật viêm tiền lâm sàng của viêm khớp dạng thấp (RA) được sử dụng rộng rãi để đánh giá cơ chế bệnh sinh và đánh giá các đích RA trị liệu (Brand *et al.*, *Nat. Protoc.* 2(5):1269-75 (2007)). Quy

trình CIA thông thường được mô tả trên Fig. 12 (các biến đổi bất kỳ trong quy trình này được đề cập dưới đây). Một cách vắn tắt, viêm khớp được kích thích vào ngày 0 bằng cách tiêm vào dưới da đuôi hỗn dịch bao gồm collagen và tá dược Freund hoàn chỉnh (CFA). Sau đó, nhóm chứng và nhóm điều trị được tiêm dưới da (s.c.) hoặc trong phúc mạc ổ bụng (i.p.) hai lần hàng tuần bắt đầu vào ngày thứ 20. Nhóm thử nghiệm đối trong thử nghiệm 1 được nêu trong bảng 5.

Bảng 5. Nhóm thử nghiệm viêm khớp do collagen (CIA) 1

Nhóm	Động vật	Điều trị	Liều	Ngày điều trị
1	10	Isotyp IgG đối chứng của chuột	600µg i.p.	2X/tuần bắt đầu vào ngày thứ 20
2	10	MAB 67	600µg i.p.	2X/tuần bắt đầu vào ngày thứ 20
3	10	etanercept	600ug s.c.	2X/tuần bắt đầu vào ngày thứ 20

Mức độ nghiêm trọng của bệnh được đánh giá sử dụng thang điểm được nêu trong bảng 6. Mỗi một móng của chuột được đánh giá cho điểm (dấu hiệu hiển vi của viêm khớp được đánh giá 3 lần hàng tuần). Chỉ số viêm khớp (AI) được tính bằng cách cộng điểm của từng móng (AI tối đa = 16). Thông thường, dấu hiệu đầu tiên của viêm khớp xuất hiện trong mẫu CIA từ 21 đến 28 ngày sau khi chủng.

Bảng 6. Phương pháp đánh giá CIA

Điểm	Mô tả
0	Không có dấu hiệu nhìn thấy của viêm khớp
1	Phù và/hoặc đỏ 1 ngón
2	Phù và/hoặc đỏ 2 ngón
3	Phù và/hoặc đỏ hơn 2 ngón
4	Viêm khớp nghiêm trọng toàn bộ móng và ngón

Kết quả của thử nghiệm 1 cho thấy sự giảm phát triển bệnh viêm khớp ở mẫu CIA trong nhóm được điều trị bằng 600 μ g MAb 67. Chỉ số viêm khớp (AI) ở chuột được điều trị bằng 600 μ g MAb 67 được so sánh với AI ở chuột được điều trị bằng 600 μ g đối chứng âm (IgG1) và 600 μ g đối chứng dương (etanercept) khi bắt đầu điều trị vào ngày 20. Kết quả được thể hiện trên Fig. 13A. Kết quả này chỉ ra rằng MAb 67 là có hiệu quả tương đương hoặc tốt hơn so với etanercept trong việc làm giảm viêm khớp ở mẫu CIA.

Thử nghiệm thứ hai (Study 2) bao gồm việc điều trị bằng MAb 67 và đối chứng dương khi làm trễ quá trình điều trị, *nghĩa là*, điều trị bắt đầu khi chỉ số viêm khớp lớn ≥ 3 . Nhóm thử nghiệm trong thử nghiệm 2 được nêu trong bảng 7.

Bảng 7. Thử nghiệm viêm khớp do collagen (CIA) 2

Nhóm	# động vật	Điều trị	Liều	Điều trị Ngày
1	10	Chuột IgG Isotyp đối chứng	600 μ g i.p.	2X/tuần bắt đầu vào ngày thứ 20
2	10	MAb 67	600 μ g i.p.	2X/tuần bắt đầu vào ngày thứ 20
3	10	MAb 67	600 μ g i.p.	2X/tuần khi chỉ số viêm khớp ≥ 3
4	10	etanercept	600ug s.c.	2X/tuần khi chỉ số viêm khớp ≥ 3

Trong thử nghiệm 2, kết quả AI trong điều trị bằng MAb 67 (điều trị bắt đầu vào ngày 20 hoặc khi AI ≥ 3) được so sánh với điều trị bằng đối chứng âm (IgG1) và đối chứng dương (etanercept; điều trị bắt đầu khi AI ≥ 3). Kết quả được thể hiện trên Fig. 13B. Kết quả này chỉ ra rằng MAb 67 là có hiệu quả tương đương hoặc tốt hơn so với etanercept trong việc làm giảm viêm khớp khi quá trình điều trị bắt đầu vào ngày thứ 20 hoặc làm trễ đến khi AI ≥ 3 . Do đó, MAb 67 được chỉ ra là có khả năng ngăn ngừa viêm khớp, cũng như điều trị viêm khớp bệnh khi AI ≥ 3 ở mẫu CIA.

Ví dụ 9: Kháng thể kháng CD100 chặn đáp ứng tế bào B nguyên phát và tế bào B nhớ *in vivo*

Chuột Balb/c và CD100-/- were được chủng ngừa bằng globulin gamma của gà liên hợp với (4-hydroxy-3-nitrophenyl) axetyl được kết tủa bằng phen (nhôm-/magie-

hydroxit) (“NP-CGG”) sau đó là điều trị bằng IgG1 đối chứng (Balb/c và CD100-/-) hoặc MAb 67 (chỉ Balb/c). Các nhóm thử nghiệm được nêu trong bảng 8.

Bảng 8. Nhóm thử nghiệm đáp ứng tế bào B nguyên phát và tế bào B nhớ

Nhóm	Chủng	Số lượng	Kháng nguyên	Ab điều trị	Liều	Tiêm Ab
1	CD100 -/-	6	N/A	N/A	N/A	N/A
2	CD100 -/-	6	NP-CGG/Phèn	IgG1 đối chứng	N/A	Ngày (-7), 0, 7, 14, 21, 28
3	Balb/c	6	N/A	N/A	N/A	N/A
4	Balb/c	6	NP-CGG/Phèn	IgG1 đối chứng	600ug	Ngày (-7), 0, 7, 14, 21, 28
5	Balb/c	6	NP-CGG/Phèn	MAb 67	600 ug	Ngày (-7), 0, 7, 14, 21, 28

Chuột được điều trị như đã đề cập trong bảng 8 bắt đầu vào ngày thứ -7 và được chủng ngừa bằng NP-CGG vào ngày 0. Ba chuột/nhóm được gây mê vào ngày 10, và lách và hạch bạch huyết được phân tích tế bào B trung mầm (GC) (“B220+CD38lowPNA+”). Mỗi lách được phân tích riêng biệt, và hạch bạch huyết của cả 3 chuột được kết hợp vào cùng một mẫu để phân tích. Quá trình điều trị số chuột còn lại được tiếp tục như được thể hiện trong bảng 8. Vào ngày 21 chuột được tiêm nhắc lại bằng NP-CGG trong phèn. Vào ngày 31 số chuột còn lại được gây mê và lách và hạch bạch huyết được phân tích tế bào B trung mầm (GC) (“B220+CD38lowPNA+”). Mỗi lách được phân tích riêng biệt, và hạch bạch huyết của cả 3 chuột được kết hợp vào cùng một mẫu để phân tích. Kết quả trên Fig. 14A và B chỉ ra rằng điều trị bằng 600µg MAb 67 đã làm giảm số lượng tế bào B GC trong lách (SP) và hạch bạch huyết (LN) sau cả chủng ngừa đầu tiên (14A) và chủng ngừa thứ phát (14B). Do đó, MAb 67 được chỉ ra là có khả năng chặn đáp ứng tế bào B nguyên phát và tế bào B nhớ *in vivo*.

Ví dụ 10: Kháng thể kháng CD100 làm chậm quá trình sinh trưởng khối u *in vivo*

Sự giảm sinh trưởng khối u nhờ MAb 67 được thử nghiệm ở mẫu chuột được ghép khối u CT26 và BCA34. Để tiến hành thử nghiệm, tế bào ung thư được tiêm vào rong cơ cẳng chân của chuột Balb/c. Bắt đầu từ ngày 1 sau khi ghép, chuột được điều trị bằng tiêm trong phúc mạc ổ bụng (i.p.) 1 lần/tuần 1mg kháng thể MAb 67 hoặc đối chứng âm (IgG) trong thể tích 0,2ml. Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) và/hoặc thể tích đuôi (mm^3) được đo để xác định tốc độ sinh trưởng của khối u. Tốc độ sinh trưởng khối u ở chuột được điều trị bằng MAb 67 so với đối chứng âm được sử dụng để tính độ trễ sinh trưởng khối u (TGD).

Khả năng sinh trưởng trong môi trường thiếu CD 100 của tế bào ung thư BCA34 và EMT6 cũng được thử nghiệm. Để thực hiện thử nghiệm này, tế bào ung thư được tiêm vào cẳng chân của chuột Balb/c và CD100-/- (SEMA4D-/-) và tốc độ sinh trưởng khối u được xác định.

Tế bào ung thư đại tràng CT26

Tế bào ung thư CT26 thu được từ khối u đại tràng của chuột và biểu hiện nồng độ CD100 rất thấp. 50000 tế bào ung thư đại tràng CT26 được tiêm s.c. vào chuột Balb/c kiểu đại (20 chuột/nhóm điều trị). Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) được đo ở chuột được điều trị bằng 1mg MAb 67 hàng tuần bắt đầu vào ngày thứ 1 sau khi ghép so với chuột được tiêm IgG đối chứng. Kết quả (thể tích khối u trung bình theo thời gian) được thể hiện trên Fig. 15. TGD của chuột được điều trị bằng MAb 67 là 17% ($p=0,0317$). Kết quả này chỉ ra rằng sự sinh trưởng khối u CT26 đã bị giảm ở chuột được điều trị bằng MAb 67.

Tế bào ung thư nguyên bào sợi BCA34

Tế bào ung thư BCA34 biểu hiện nồng độ CD100 rất thấp. Đầu tiên, 50000 tế bào ung thư BCA34 được tiêm s.c. vào vùng bụng của chuột Balb/c kiểu đại hoặc CD100-/- (“SEMA4D-/-”). Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) được đo, và kết quả được

thể hiện trên Fig. 16A. Kết quả này chỉ ra rằng sự sinh trưởng khối u BCA34 bị suy giảm trong môi trường thiếu CD100.

Trong một thử nghiệm riêng biệt, 50000 tế bào ung thư BCA34 được tiêm s.c. vào chuột Balb/c kiểu đại (21 chuột/nhóm điều trị). Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) được đo ở chuột được điều trị bằng 1mg MAb 67 hàng tuần bắt đầu vào ngày thứ 1 sau khi ghép so với chuột được tiêm IgG đối chứng. Kết quả (thể tích khối u trung bình theo thời gian) được thể hiện trên Fig. 16B. TGD của chuột được điều trị bằng MAb 67 là 18% ($p=0,009$). Kết quả này chỉ ra rằng sự sinh trưởng khối u BCA34 đã bị giảm ở chuột được điều trị bằng MAb 67.

Tế bào ung thư cacxinom vú EMT6

Tế bào ung thư EMT6 thu được từ khối u cacxinom vú của chuột và biểu hiện nồng độ CD100 trung bình. 50000 tế bào ung thư EMT6 được tiêm s.c. vào chuột Balb/c kiểu đại. Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) được đo ở chuột. Kết quả (thể tích khối u trung bình theo thời gian) được thể hiện trên Fig. 17. Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) được thể hiện ở chuột Balb/c kiểu đại và chuột CD100-/- ("SEMA4D-/-"). Kết quả này chỉ ra rằng sự sinh trưởng khối u EMT6 bị suy giảm trong môi trường thiếu CD100.

Ví dụ 11: Kháng thể kháng CD100 là chậm quá trình sinh trưởng của khối u ở người *in vivo*

Sự giảm sinh trưởng khối u nhờ MAb 2503 được thử nghiệm trong mẫu động vật được ghép khối u HN12 và HN6 HIF1a mODD của người. HN12 và HN6 HIF1a mODD thu được từ khối u vùng đầu và cổ của người, và cả hai đều biểu hiện nồng độ HIF1a và CD100 cao. Mẫu HN6 HIF-1a mODD được đề cập trong Sun *et al.*, *J Biol Chem* 284(46):32066-74 (2009). Để thực hiện thử nghiệm, 2 khối u/chuột được tiêm dưới da vào chuột trần không có tuyến ức (10 chuột/nhóm điều trị). Bắt đầu từ ngày 1 sau khi ghép, chuột được điều trị bằng tiêm trong phúc mạc ổ bụng (i.p.) 1 lần/tuần 1mg kháng thể MAb 2503 hoặc đối chứng âm (IgG) trong thể tích 0,2ml. Sự thay đổi thể tích khối u (mm^3) và/hoặc thể tích đùi (mm^3) được đo để xác định tốc độ sinh

trường của khối u. Tốc độ sinh trưởng khối u ở chuột HN6 HIF-1a mODD được điều trị bằng MAb 2503 so với đối chứng âm được sử dụng để tính độ trễ sinh trưởng khối u (TGD).

Mục tiêu của thử nghiệm này là TGD. Kết quả sinh trưởng khối u trong quá trình điều trị bằng MAb 2503 ở mẫu HN12 và HN6 HIF-1a mODD được thể hiện trên Fig 18 và 19A. TGD ở chuột HN6 HIF-1a mODD được điều trị bằng MAb 2503 là 13% ($p=00008$). Hơn nữa, hình ảnh của khối u ở chuột được ghép HN6 HIF-1a mODD được điều trị bằng đối chứng IgG4 và MAb 2505 được thể hiện trên Fig. 19B. Kết quả này chỉ ra rằng điều trị bằng MAb 2503 giảm tốc độ sinh trưởng của khối u vùng đầu và cổ của người *in vivo*.

Ví dụ 12: Dòng tế bào CHO-S ổn định để biểu hiện nồng độ MAb 2503 cao

Dòng tế bào CHO-S ổn định được tạo ra để biểu hiện MAb 2503 ở nồng độ cao ADN bổ trợ mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được làm cho có tính chất giống người đơn dòng kháng CD100 2503 được sử dụng để tạo ra dòng tế bào trứng của chuột (CHO-S) sử dụng kỹ thuật GPEx™ (Catalent Pharma Solutions, Madison, Wisconsin) và tế bào CHO-S gốc (tham khảo Bleck *et al.*, “An Alternative Method for the Rapid Generation of Stable, High- Expressing Mammalian Cell Line,” BioProcessing JouARNI (September/October 2005)).

Sau khi tác dòng một dòng tế bào, thể tách dòng biểu hiện được chọn bằng cách nuôi cấy trong môi trường và quá trình sản xuất kháng thể, và ngân hàng tìm kiếm tế bào biểu hiện sống sót được tạo ra. Kháng thể được tạo ra bởi thể tách dòng được xác định đặc điểm về độ đặc hiệu và ái lực sử dụng thử nghiệm chức năng *in vitro* và *in vivo* (chẳng hạn, thử nghiệm phong bế dòng tế bào và thử nghiệm tách dính tế bào). Sau đó, tế bào trong thể tách dòng CHO được chọn được nuôi cấy và phát triển trong môi trường nuôi cấy và ngân hàng thứ hai (ngân hàng giống gốc) được tạo ra và làm đông lạnh. Tế bào trong một ống của ngân hàng giống gốc được nuôi cấy tiếp tục và sử dụng để sản xuất cGMP của ngân hàng tế bào Master (MCB).

Ví dụ 13: Liều lượng của kháng thể kháng CD100 và kết quả của thử nghiệm PK ở chuột và khỉ

Phân tích bão hòa sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 ở chuột và khỉ được thực hiện.

Thử nghiệm ở chuột: 36 chuột Sprague-Dawley (3/giới/nhóm) được tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 dao động từ 0,01 đến 100mg/kg. Thử nghiệm bão hòa dựa trên phương pháp đo dòng chảy tế bào được thực hiện trên mẫu máu toàn phần được phân giải tại các thời điểm khác nhau để đánh giá tỷ lệ phần trăm đích tế bào (SEMA4D) được làm bão hòa bằng MAb 2503. Có sự tương qua số liệu tốt với lượng MAb được phát hiện trong huyết thanh, chỉ ra rằng quá trình bão hòa phụ thuộc vào lượng được chất tự do trong huyết thanh, và tế bào đã được làm bão hòa khi khoảng 1 đến 5ug/ml được chất tự do được phát hiện trong huyết thanh. Tỷ lệ phần trăm bão hòa SEMA4D ở liều lượng MAb 2503 là 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10, và 100mg/kg ở chuột đực và cái được thể hiện trên Fig. 20A và 20B.

Nghiên cứu ở khỉ: 28 khỉ (2/giới/nhóm; 4/giới/nhóm chứng) được tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất MAb 2503 dao động từ 0,01 đến 100mg/kg. Thử nghiệm bão hòa dựa trên phương pháp đo dòng chảy tế bào được thực hiện trên mẫu máu toàn phần được phân giải tại các thời điểm khác nhau để đánh giá tỷ lệ phần trăm đích tế bào (SEMA4D) được làm bão hòa bằng MAb 2503. Có sự tương qua số liệu tốt với lượng MAb được phát hiện trong huyết thanh, chỉ ra rằng quá trình bão hòa phụ thuộc vào lượng được chất tự do trong huyết thanh, và tế bào đã được làm bão hòa khi khoảng 1 đến 5ug/ml được chất tự do được phát hiện trong huyết thanh. Tỷ lệ phần trăm bão hòa SEMA4D ở liều lượng MAb 2503 là 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10, và 100mg/kg ở khỉ đực và khỉ cái được thể hiện trên Fig. 21. Kết quả của thử nghiệm này ở chuột và khỉ là rất giống nhau.

Kết quả dược động lực học (PK) bao gồm thời gian bán hủy sinh học (giờ (ngày)), nồng độ kháng thể trong huyết tương tại thời điểm 0 sau khi tiêm (C_0), và diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương từ thời điểm 0 đến thời điểm t

(AUC_{0-t}) đối với một liều tiêm tĩnh mạch là 0,01, 0,1, 1,0, 10, hoặc 100mg/kg MAb 2503 ở chuột và khi được nêu trong bảng 9.

Bảng 9. Giá trị PK của kháng thể 2503 ở chuột và linh trưởng (khỉ Cynomolgus)

Liều (mg/kg)	Thời gian bán hủy (giờ (ngày))		C ₀ (μg/mL)		AUC _{0-t}	
	Khi	Chuột	Khi	Chuột	Khi	Chuột
0,01			0,1051	Không số liệu	0,3573	Không số liệu
Pha A	0,1649 (0,01)	Không số liệu				
Pha B	43,21 (1,80)	Không số liệu				
0,1			3,356	1,99	23,09	11,40
Pha A	0,1659 (0,01)	3,47 (0,14)				
Pha B	6,829 (0,28)	Không số liệu				
1,0			39,35	34,14	1,974	834,7
Pha A	3,175 (0,13)	0,636 (0,026)				
Pha B	43,69 (1,82)	27,77 (1,2)				
10			327,1	317,7	38,741	27,431
Pha A	3,075 (0,13)	5,85 (0,24)				
Pha B	109,4 (4,56)	105,7 (4,4)				
100			3,681	3,305	477,15 4	488,194
Pha A	6,978 (0,29)	9,20 (0,38)				
Pha B	239,8 (9,99)	246,2 (10,3)				

Thời gian bán hủy trong pha loại thải của MAb 2503 được phát hiện là tương tự giữa chuột và khi, và dao động từ khoảng 6 giờ đến khoảng 10 ngày theo kiểu phụ thuộc liều. Cả kết quả của thử nghiệm bão hòa và PK đều có kiểu phụ thuộc liều và cho thấy đặc tính tương tự giữa chuột và khi. Hơn nữa, không có đặc tính gây độc đáng kể đối với MAb 2503 ở liều dao động từ 0,01 đến 100mg/kg ở chuột hoặc khi.

Phần mô tả về các phương án cụ thể trên đây sẽ bộc lộ toàn bộ bản chất chung của sáng chế mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện bằng những hiểu biết của mình, các biến đổi cần thiết để ứng dụng vào các phương án khác mà

không cần quá trình thử nghiệm không cần thiết, cũng như không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế. Do đó, các biến đổi như vậy cũng sẽ thuộc phạm vi của các phương án được mô tả, dựa trên phân giải thích và thảo luận nêu trong bản mô tả này. Cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ có mục đích minh họa và không giới hạn, sao cho thuật ngữ này là dễ hiểu với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên phần mô tả và giải thích của sáng chế.

Phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả trên đây mà sẽ được xác định bởi phần yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD100, chứa polypeptit vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và polypeptit vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó VH bao gồm trình tự axit amin VH-CDR1, VH-CDR2, và VH-CDR3 lần lượt là SEQ ID NO: 6, 7, và 8; và VL bao gồm trình tự axit amin VL-CDR1, VL-CDR2, và VL-CDR3 lần lượt là SEQ ID NO: 14, 15, và 16.
2. Kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó:
 - i. VH chứa trình tự axit amin giống ít nhất 90% so với SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10;
 - ii. VL chứa trình tự axit amin giống ít nhất 90% so với SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 18;
 - iii. VH chứa trình tự axit amin giống ít nhất 90% so với SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và VL chứa trình tự axit amin giống ít nhất 90% so với SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 18; hoặc
 - iv. Kháng thể hoặc mảnh của nó là kháng thể đơn dòng mà chứa VH được mã hóa bằng polynucleotit được nộp lưu dưới số ATCC PTA-10004 và VL được mã hóa bằng polynucleotit được nộp lưu dưới số ATCC PTA-10005.
3. Kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó này còn chứa vùng không đổi của người.
4. Kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể mạch đơn, mảnh Fab, mảnh F(ab)₂, và mảnh Fv.
5. Kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó này ức chế CD100 để không gắn kết với thụ thể CD100.
6. Kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó này được làm cho giống như của người, giống như của linh trưởng hoặc khảm.

7. Kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể phân lập hoặc mảnh của nó này còn chứa polypeptit khác loại được liên hợp với nó.
8. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và chất mang.
9. Polynucleotit chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 2.
10. Chế phẩm chứa polynucleotit mã hóa VH phân lập và polynucleotit mã hóa VL phân lập,
 - i. trong đó polynucleotit mã hóa VH sẽ mã hóa VH chứa trình tự axit amin VH-CDR1, VH-CDR2, và VH-CDR3 lần lượt là SEQ ID NO: 6, 7, và 8; trong đó polynucleotit mã hóa VL sẽ mã hóa VL chứa trình tự axit amin VL-CDR1, VL-CDR2, và VL-CDR3 lần lượt là SEQ ID NO: 14, 15, và 16; hoặc
 - ii. trong đó polynucleotit mã hóa VH chứa SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20 và polynucleotit mã hóa VL chứa SEQ ID NO: 21 hoặc SEQ ID NO: 22; và trong đó, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa VH và VL gắn kết đặc hiệu với CD100.
11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó polynucleotit mã hóa VH và polynucleotit mã hóa VL được chứa trong cùng một vectơ hoặc trong các vectơ riêng biệt.
12. Tế bào chủ bao gồm vectơ chứa polynucleotit theo điểm 9 hoặc chế phẩm theo điểm 11.
13. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh của nó mà liên kết đặc hiệu với CD100, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 12, và thu kháng thể hoặc mảnh của nó.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Smith, Ernest S.
Fisher, Terrence Lee

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN CHUYỂN MÀNG CD100, CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

<130> 1843.060PC02/EJH/BNC

<140> Được đặt tên

<141> Herewith

<150> 61/325,213

<151> 2010-04-16

<150> 61/176,826

<151> 2009-05-08

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 862

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
1 5 10 15

Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
20 25 30

Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
35 40 45

Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
50 55 60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80

Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys
85 90 95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
100 105 110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
115 120 125

Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
130 135 140

Phe	Leu	Gly	Lys	Asn	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Asp	Pro	145	150	155	160
Ala	His	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Met	Val	Asp	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ser	Gly	165	170	175	
Thr	Ser	Tyr	Asn	Phe	Leu	Gly	Ser	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg	Asn	Ser	180	185	190	
Ser	His	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ile	Pro	Trp	Leu	Asn	Glu	195	200	205	
Pro	Ser	Phe	Val	Phe	Ala	Asp	Val	Ile	Arg	Lys	Ser	Pro	Asp	Ser	Pro	210	215	220	
Asp	Gly	Glu	Asp	Asp	Arg	Val	Tyr	Phe	Phe	Phe	Thr	Glu	Val	Ser	Val	225	230	235	240
Glu	Tyr	Glu	Phe	Val	Phe	Arg	Val	Leu	Ile	Pro	Arg	Ile	Ala	Arg	Val	245	250	255	
Cys	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Trp	Thr	260	265	270	
Ser	Phe	Leu	Lys	Ala	Arg	Leu	Ile	Cys	Ser	Arg	Pro	Asp	Ser	Gly	Leu	275	280	285	
Val	Phe	Asn	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Pro	Gly	Leu	290	295	300	
Lys	Val	Pro	Val	Phe	Tyr	Ala	Leu	Phe	Thr	Pro	Gln	Leu	Asn	Asn	Val	305	310	315	320
Gly	Leu	Ser	Ala	Val	Cys	Ala	Tyr	Asn	Leu	Ser	Thr	Ala	Glu	Glu	Val	325	330	335	
Phe	Ser	His	Gly	Lys	Tyr	Met	Gln	Ser	Thr	Thr	Val	Glu	Gln	Ser	His	340	345	350	
Thr	Lys	Trp	Val	Arg	Tyr	Asn	Gly	Pro	Val	Pro	Lys	Pro	Arg	Pro	Gly	355	360	365	
Ala	Cys	Ile	Asp	Ser	Glu	Ala	Arg	Ala	Ala	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	370	375	380	
Asn	Leu	Pro	Asp	Lys	Thr	Leu	Gln	Phe	Val	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Met	385	390	395	400
Asp	Asp	Ser	Val	Thr	Pro	Ile	Asp	Asn	Arg	Pro	Arg	Leu	Ile	Lys	Lys	405	410	415	

Asp	Val	Asn	Tyr	Thr	Gln	Ile	Val	Val	Asp	Arg	Thr	Gln	Ala	Leu	Asp	420	425	430	
Gly	Thr	Val	Tyr	Asp	Val	Met	Phe	Val	Ser	Thr	Asp	Arg	Gly	Ala	Leu	435	440	445	
His	Lys	Ala	Ile	Ser	Leu	Glu	His	Ala	Val	His	Ile	Ile	Glu	Glu	Thr	450	455	460	
Gln	Leu	Phe	Gln	Asp	Phe	Glu	Pro	Val	Gln	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	465	470	475	480
Lys	Lys	Gly	Asn	Arg	Phe	Val	Tyr	Ala	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Val	Val	485	490	495	
Gln	Ala	Pro	Leu	Ala	Phe	Cys	Gly	Lys	His	Gly	Thr	Cys	Glu	Asp	Cys	500	505	510	
Val	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Tyr	Cys	Ala	Trp	Ser	Pro	Pro	Thr	Ala	Thr	515	520	525	
Cys	Val	Ala	Leu	His	Gln	Thr	Glu	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Ile	Gln	530	535	540	
Glu	Met	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Val	Cys	Pro	Asp	Lys	Ser	Lys	Gly	Ser	545	550	555	560
Tyr	Arg	Gln	His	Phe	Phe	Lys	His	Gly	Gly	Thr	Ala	Glu	Leu	Lys	Cys	565	570	575	
Ser	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Trp	Lys	Phe	Gln	Asn	Gly	580	585	590	
Val	Leu	Lys	Ala	Glu	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Leu	Met	Gly	Arg	Lys	Asn	595	600	605	
Leu	Leu	Ile	Phe	Asn	Leu	Ser	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Gln	Cys	610	615	620	
Leu	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Lys	Asn	Lys	Thr	Val	Phe	Gln	Val	Val	Ala	625	630	635	640
Lys	His	Val	Leu	Glu	Val	Lys	Val	Val	Pro	Lys	Pro	Val	Val	Ala	Pro	645	650	655	
Thr	Leu	Ser	Val	Val	Gln	Thr	Glu	Gly	Ser	Arg	Ile	Ala	Thr	Lys	Val	660	665	670	
Leu	Val	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Val	Gln	675	680	685	

Ala Thr Ser Ser Gly	Ala Ile Thr Leu Pro	Pro Lys Pro Ala Pro Thr
690	695	700
Gly Thr Ser Cys Glu	Pro Lys Ile Val Ile	Asn Thr Val Pro Gln Leu
705	710	715 720
His Ser Glu Lys Thr	Met Tyr Leu Lys Ser	Ser Asp Asn Arg Leu Leu
725	730	735
Met Ser Leu Phe Leu	Phe Phe Phe Val Leu	Phe Leu Cys Leu Phe Phe
740	745	750
Tyr Asn Cys Tyr Lys	Gly Tyr Leu Pro Arg	Gln Cys Leu Lys Phe Arg
755	760	765
Ser Ala Leu Leu Ile	Gly Lys Lys Lys Pro	Lys Ser Asp Phe Cys Asp
770	775	780
Arg Glu Gln Ser Leu	Lys Glu Thr Leu Val	Glu Pro Gly Ser Phe Ser
785	790	795 800
Gln Gln Asn Gly Glu	His Pro Lys Pro Ala	Leu Asp Thr Gly Tyr Glu
805	810	815
Thr Glu Gln Asp Thr	Ile Thr Ser Lys Val	Pro Thr Asp Arg Glu Asp
820	825	830
Ser Gln Arg Ile Asp	Asp Leu Ser Ala Arg	Asp Lys Pro Phe Asp Val
835	840	845
Lys Cys Glu Leu Lys	Phe Ala Asp Ser Asp	Ala Asp Gly Asp
850	855	860

<210> 2
 <211> 861
 <212> PRT
 <213> Murine sp.
 <400> 2

Met Arg Met Cys Ala	Pro Val Arg Gly Leu	Phe Leu Ala Leu Val Val
1	5	10 15
Val Leu Arg Thr Ala	Val Ala Phe Ala Pro	Val Pro Arg Leu Thr Trp
20	25	30
Glu His Gly Glu Val	Gly Leu Val Gln Phe	His Lys Pro Gly Ile Phe
35	40	45
Asn Tyr Ser Ala Leu	Leu Met Ser Glu Asp	Lys Asp Thr Leu Tyr Val
50	55	60
Gly Ala Arg Glu Ala	Val Phe Ala Val Asn	Ala Leu Asn Ile Ser Glu

65					70					75				80	
Lys	Gln	His	Glu	Val	Tyr	Trp	Lys	Val	Ser	Glu	Asp	Lys	Lys	Ser	Lys
85					90					95					
Cys	Ala	Glu	Lys	Gly	Lys	Ser	Lys	Gln	Thr	Glu	Cys	Leu	Asn	Tyr	Ile
100					105					110					
Arg	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Tyr	Val	Cys	Gly	Thr
115					120					125					
Asn	Ala	Phe	Gln	Pro	Thr	Cys	Asp	His	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Phe	Lys
130					135					140					
Phe	Leu	Gly	Lys	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Asp	Pro
145					150					155					160
Ala	His	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Met	Val	Gly	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ser	Gly
165					170					175					
Thr	Ser	Tyr	Asn	Phe	Leu	Gly	Ser	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg	Asn	Ser
180					185					190					
Ser	His	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ile	Pro	Trp	Leu	Asn	Glu
195					200					205					
Pro	Ser	Phe	Val	Phe	Ala	Asp	Val	Ile	Gln	Lys	Ser	Pro	Asp	Gly	Pro
210					215					220					
Glu	Gly	Glu	Asp	Asp	Lys	Val	Tyr	Phe	Phe	Phe	Thr	Glu	Val	Ser	Val
225					230					235					240
Glu	Tyr	Glu	Phe	Val	Phe	Lys	Leu	Met	Ile	Pro	Arg	Val	Ala	Arg	Val
245					250					255					
Cys	Lys	Gly	Asp	Gln	Gly	Gly	Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Trp	Thr
260					265					270					
Ser	Phe	Leu	Lys	Ala	Arg	Leu	Ile	Cys	Ser	Lys	Pro	Asp	Ser	Gly	Leu
275					280					285					
Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Val	Leu	Arg	Ala	Pro	Gly	Leu
290					295					300					
Lys	Glu	Pro	Val	Phe	Tyr	Ala	Val	Phe	Thr	Pro	Gln	Leu	Asn	Asn	Val
305					310					315					320
Gly	Leu	Ser	Ala	Val	Cys	Ala	Tyr	Thr	Leu	Ala	Thr	Val	Glu	Ala	Val
325					330					335					
Phe	Ser	Arg	Gly	Lys	Tyr	Met	Gln	Ser	Ala	Thr	Val	Glu	Gln	Ser	His

340	345	350
Thr Lys Trp Val Arg	Tyr Asn Gly Pro Val	Pro Thr Pro Arg Pro Gly
355	360	365
Ala Cys Ile Asp Ser	Glu Ala Arg Ala Ala	Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
370	375	380
Asn Leu Pro Asp Lys	Thr Leu Gln Phe Val	Lys Asp His Pro Leu Met
385	390	395
Asp Asp Ser Val Thr	Pro Ile Asp Asn Arg	Pro Lys Leu Ile Lys Lys
405	410	415
Asp Val Asn Tyr Thr	Gln Ile Val Val Asp	Arg Thr Gln Ala Leu Asp
420	425	430
Gly Thr Phe Tyr Asp	Val Met Phe Ile Ser	Thr Asp Arg Gly Ala Leu
435	440	445
His Lys Ala Val Ile	Leu Thr Lys Glu Val	His Val Ile Glu Glu Thr
450	455	460
Gln Leu Phe Arg Asp	Ser Glu Pro Val Leu	Thr Leu Leu Leu Ser Ser
465	470	475
Lys Lys Gly Arg Lys	Phe Val Tyr Ala Gly	Ser Asn Ser Gly Val Val
485	490	495
Gln Ala Pro Leu Ala	Phe Cys Glu Lys His	Gly Ser Cys Glu Asp Cys
500	505	510
Val Leu Ala Arg Asp	Pro Tyr Cys Ala Trp	Ser Pro Ala Ile Lys Ala
515	520	525
Cys Val Thr Leu His	Gln Glu Glu Ala Ser	Ser Arg Gly Trp Ile Gln
530	535	540
Asp Met Ser Gly Asp	Thr Ser Ser Cys Leu	Asp Lys Ser Lys Glu Ser
545	550	555
Phe Asn Gln His Phe	Phe Lys His Gly Gly	Thr Ala Glu Leu Lys Cys
565	570	575
Phe Gln Lys Ser Asn	Leu Ala Arg Val Val	Trp Lys Phe Gln Asn Gly
580	585	590
Glu Leu Lys Ala Ala	Ser Pro Lys Tyr Gly	Phe Val Gly Arg Lys His
595	600	605
Leu Leu Ile Phe Asn	Leu Ser Asp Gly Asp	Ser Gly Val Tyr Gln Cys

610	615	620
Leu Ser Glu Glu Arg	Val Arg Asn Lys Thr	Val Ser Gln Leu Leu Ala
625	630	635 640
Lys His Val Leu Glu	Val Lys Met Val Pro	Arg Thr Pro Pro Ser Pro
645	650	655
Thr Ser Glu Asp Ala	Gln Thr Glu Gly Ser	Lys Ile Thr Ser Lys Met
660	665	670
Pro Val Ala Ser Thr	Gln Gly Ser Ser Pro	Pro Thr Pro Ala Leu Trp
675	680	685
Ala Thr Ser Pro Arg	Ala Ala Thr Leu Pro	Pro Lys Ser Ser Ser Gly
690	695	700
Thr Ser Cys Glu Pro	Lys Met Val Ile Asn	Thr Val Pro Gln Leu His
705	710	715 720
Ser Glu Lys Thr Val	Tyr Leu Lys Ser Ser	Asp Asn Arg Leu Leu Met
725	730	735
Ser Leu Leu Leu Phe	Ile Phe Val Leu Phe	Leu Cys Leu Phe Ser Tyr
740	745	750
Asn Cys Tyr Lys Gly	Tyr Leu Pro Gly Gln	Cys Leu Lys Phe Arg Ser
755	760	765
Ala Leu Leu Leu Gly	Lys Lys Thr Pro Lys	Ser Asp Phe Ser Asp Leu
770	775	780
Glu Gln Ser Val Lys	Glu Thr Leu Val Glu	Pro Gly Ser Phe Ser Gln
785	790	795 800
Gln Asn Gly Asp His	Pro Lys Pro Ala Leu	Asp Thr Gly Tyr Glu Thr
805	810	815
Glu Gln Asp Thr Ile	Thr Ser Lys Val Pro	Thr Asp Arg Glu Asp Ser
820	825	830
Gln Arg Ile Asp Glu	Leu Ser Ala Arg Asp	Lys Pro Phe Asp Val Lys
835	840	845
Cys Glu Leu Lys Phe	Ala Asp Ser Asp Ala	Asp Gly Asp
850	855	860

<210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VH CDR1

<400> 3

ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac

30

<210> 4

<211> 51

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VH CDR2

<400> 4

cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c

51

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VH CDR3

<400> 5

tattactacg gcagacactt cgatgtc

27

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptide kháng CD100 VH CDR1

<400> 6

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His

1

5

10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptide kháng CD100 VH CDR2

<400> 7

Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VH CDR3
 <400> 8

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val
 1 5

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VH 2503
 <400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VH 67
 <400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Asn Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 45

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL CDR1

<400> 11

aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac
45

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL CDR2

<400> 12

gctgcatcca atctggaaag c
21

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL CDR3

<400> 13

cagcaaagca atgaggatcc ctacacc
27

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL CDR1
 <400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL CDR2
 <400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL CDR3
 <400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL 2503
 <400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 18
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL 67
 <400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit kháng CD100 VH 2503
 <400> 19

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag
 cgtgaaggtc 60

tcttgcaagg ctagcggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt
gagacaggcc 120

cctggccaag gcctggagtg gatggggccag attaataccta ccactggcgg
cgctagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag
cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt attactgtgc
cagatattac 300

tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca
354

<210> 20

<211> 354

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VH 67

<400> 20

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggcttc
agtgaagata 60

tcttgcaagg cttctgggta ctcattcagt gactactaca tgcactgggt
gaagcaaagt 120

cctgaaaata gtcttgagtg gattggacag attaataccta ccactggggg
tgctagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag
cacagcctac 240

atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac
aagatattac 300

tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca
354

<210> 21

<211> 333

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL 2503

<400> 21

gacatcgtga tgacccagag cccagacagc ctgggtgtga gcctggggcga
gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat
gaactggtac 120

cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctgatttacg ctgcatccaa
tctggaaagc 180

ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag atttcactct
gaccatcagc 240

agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga
ggatccctac 300

accttcggcc aagggaccaa gctcgagatc aaa
333

<210> 22

<211> 333

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL 67

<400> 22

gacattgtga tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
gaggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggcg atagttatat
gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa
tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct
caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga
ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctcgagatc aaa
333

<210> 23

<211> 2586

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

atgaggatgt gcacccccat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat
gtttgggaca 60

gcgatggcat ttgcacccat accccggatc acctgggagc acagagaggt
gcacctggtg 120

cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga
 ggacaaggac 180

accttgtaca taggtgcccg ggaggcggtc ttcgctgtga acgcactcaa
 catctccgag 240

aagcagcatg aggtgtattg gaaggctctca gaagacaaaa aagcaaaatg
 tgcagaaaaag 300

gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc
 actcagcgcc 360

acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca
 cctgaactta 420

acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaag gaagatgtcc
 ctttgacca 480

gcacacagct acacatccgt catgggtgat ggagaacttt attcggggag
 gtcgtataat 540

tttttgggaa gtgaacccat catctcccga aattcttccc acagtccctt
 gaggacagaa 600

tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat
 ccgaaaaagc 660

ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga
 ggtgtctgtg 720

gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgata ccacggatag caagagtgtg
 caagggggac 780

cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tcctgaaagc
 ccgactcatc 840

tgctcccggc cagacagcgg cttggctcttc aatgtgctgc gggatgtctt
 cgtgctcagg 900

tccccgggcc tgaagggtgcc tgtgttctat gcactcttca cccacagct
 gaacaacgtg 960

gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt
 ctcccacggg 1020

aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg
 ctataatggc 1080

ccggtaccca agccgcggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc
 cgccaactac 1140

accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca
ccctttgatg 1200

gatgactcgg taaccccaat agacaacagg cccagggttaa tcaagaaaga
tgtgaactac 1260

acccagatcg tgggtggaccg gacccaggcc ctggatggga ctgtctatga
tgtcatgttt 1320

gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc
tgttcacatc 1380

atcgaggaga cccagctctt ccaggacttt gagccagtcc agaccctgct
gctgtcttca 1440

aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtgggtcca
ggccccgctg 1500

gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgcggga
cccctactgc 1560

gcctggagcc cgcccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag
ccccagcagg 1620

ggtttgattc aggagatgag cggcgatgct tctgtgtgcc cggataaaag
taaaggaagt 1680

taccggcagc attttttcaa gcacggtggc acagcggaac tgaaatgctc
ccaaaaatcc 1740

aacctggccc gggctctttg gaagttccag aatggcgtgt tgaaggccga
gagccccaag 1800

tacgggtctta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg
agacagtggg 1860

gtgtaccagt gcctgtcaga ggagagggtt aagaacaaaa cggctcttcca
agtggtcgcc 1920

aagcacgtcc tggaagtga ggtgggtcca aagcccgtag tggccccac
cttgtcagtt 1980

gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttgg tggcatccac
ccaagggtct 2040

tctcccccaa cccagccgt gcaggccacc tcctccgggg ccatcacct
tcctccaag 2100

cctgcgccca ccggcacatc ctgcgaacca aagatcgtca tcaacacggt
ccccagctc 2160

cactcggaga aaaccatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat
gtccctcttc 2220

ctcttcttct ttgttctctt cctctgcctc tttttctaca actgctataa
gggatacctg 2280

cccagacagt gcttgaaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaagaa
gcccaagtca 2340

gatttctgtg accgtgagca gagcctgaag gagacgttag tagagccagg
gagcttctcc 2400

cagcagaatg gggagcaccc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac
cgagcaagac 2460

accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatcga
cgacctttct 2520

gccagggaca agccctttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc
agacgcagat 2580

ggagac
2586

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Peptit epitope of proteolipid protein PLP(139-151)
<400> 24

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Polypeptit kháng CD100 VH 76
<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit kháng CD100 VH 76 CDR1

<400> 26

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit kháng CD100 VH 76 CDR2

<400> 27

Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit kháng CD100 VH 76 CDR3

<400> 28

Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser
1 5

<210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL 76
 <400> 29

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Thr	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asn	Val	Trp
20					25					30					
Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35					40					45					
Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Ser	Tyr	Pro	Tyr
85					90					95					
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
100					105										

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL 76 CDR1
 <400> 30

His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asn	Val	Trp	Leu	Ser
1				5					10	

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polypeptit kháng CD100 VL 76 CDR2
 <400> 31

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit kháng CD100 VL 76 CDR3

<400> 32

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 33

<211> 354

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VH 76

<400> 33

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc
agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtactgga tgcactgggt
aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcactgggta
ttctgattac 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag
cacagcctac 240

atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc
aagagacccc 300

tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 34

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VH 76 CDR1

<400> 34

ggctacacct ttactaggta ctggatgcac
30

<210> 35

<211> 51

<212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit kháng CD100 VH 76 CDR2
 <400> 35
 tacattaatc ctagcactgg ttattctgat tacaatcaga agttcaagga c
 51

<210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit kháng CD100 VH 76 CDR3
 <400> 36
 gacccctacg gctggactat ggactcc
 27

<210> 37
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit kháng CD100 VL 76
 <400> 37
 gacatccaga tgacccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga
 cacaattacc 60

atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca
 gcagaaacca 120

ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg
 cgtcccatca 180

aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag
 cctgcagcct 240

gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac
 gttcggaggg 300

gggaccaagc tcgagatcaa a
 321

<210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Polynucleotit kháng CD100 VL 76 CDR1
 <400> 38

catgccagtc agaacattaa tgtttggtta agc
33

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL 76 CDR2

<400> 39

aaggcttcca acttgcacac a
21

<210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit kháng CD100 VL 76 CDR3

<400> 40

caacagggtc aaagttatcc gtacacg
27

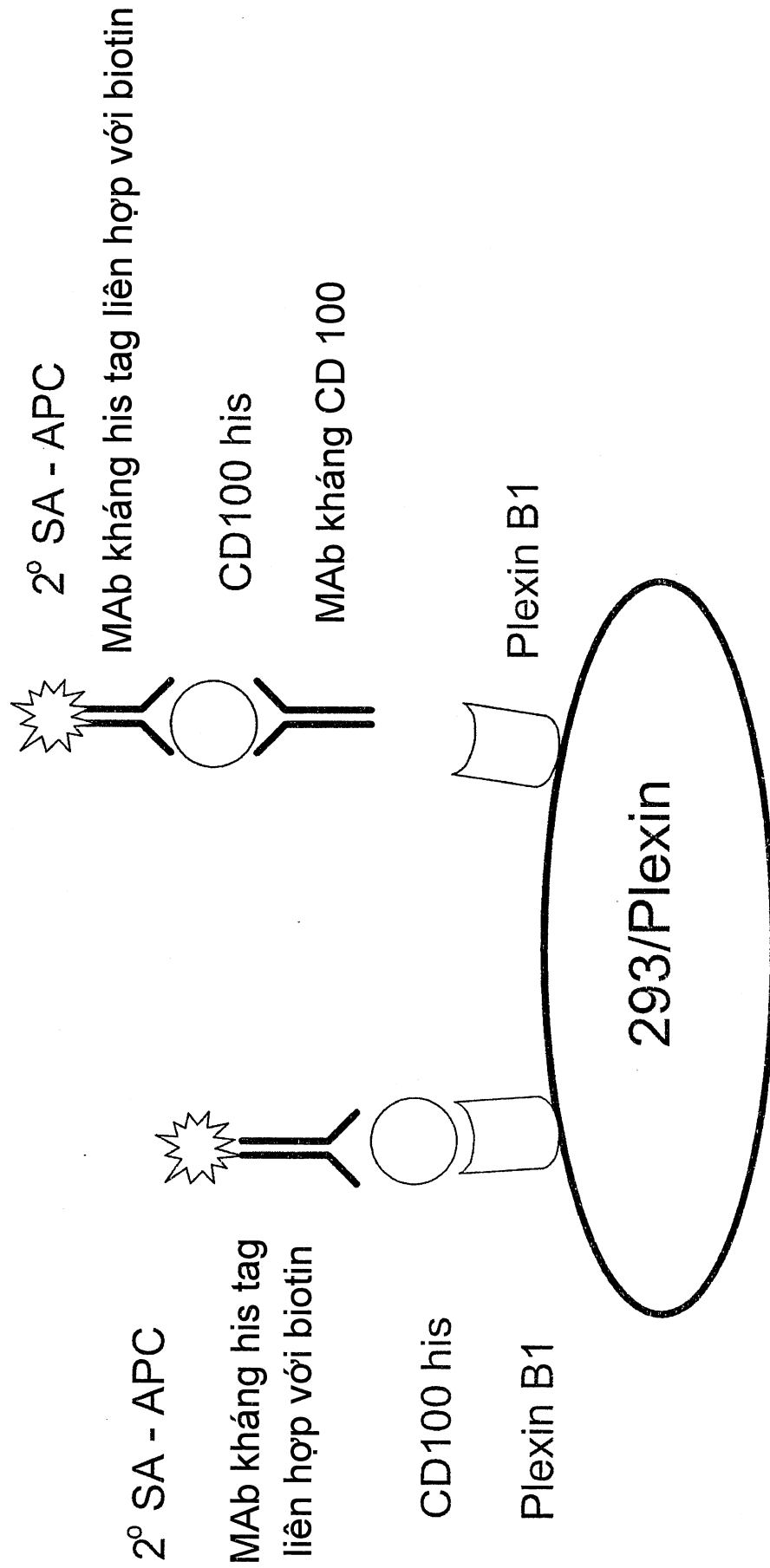


FIG. 1

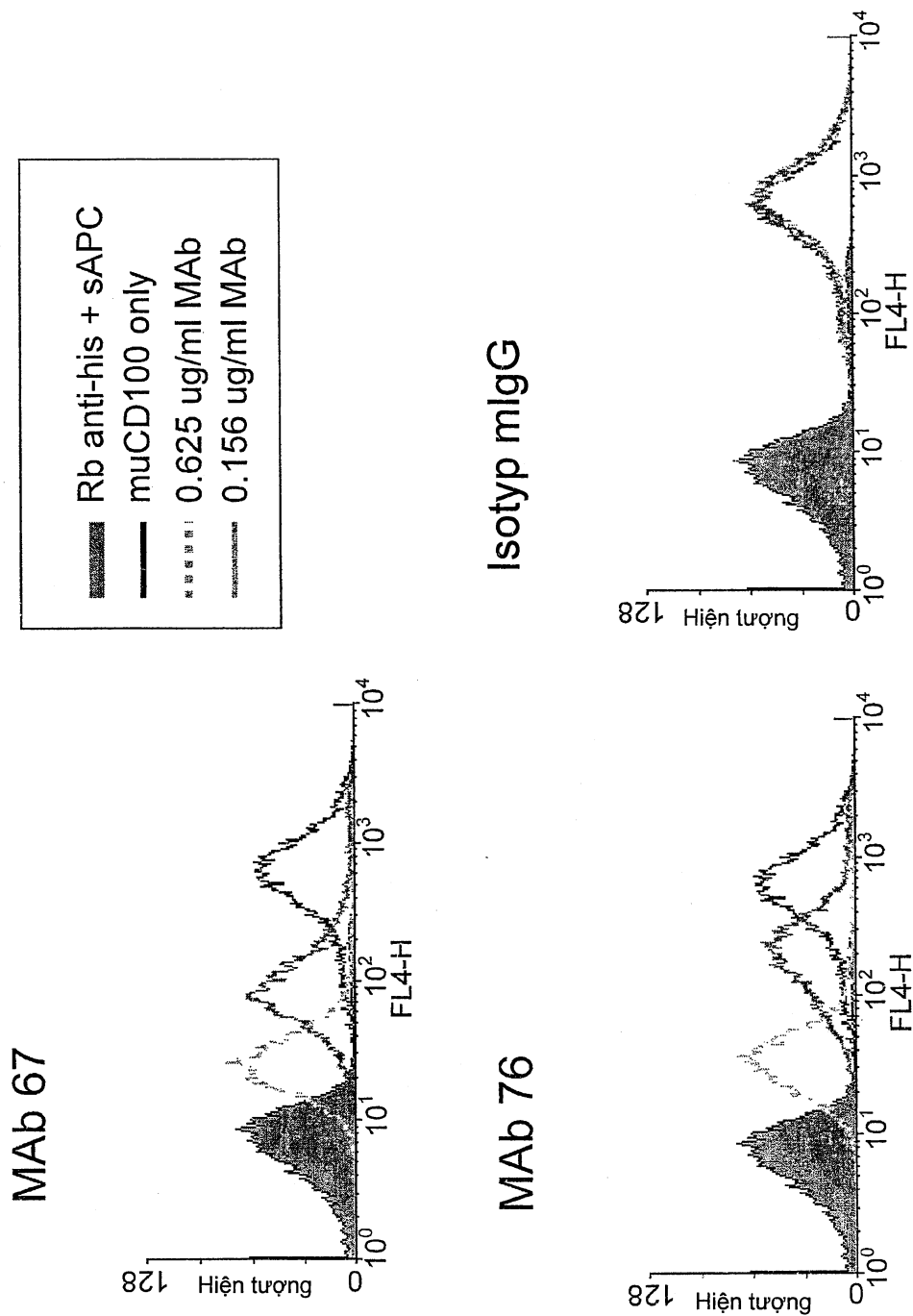


FIG. 2

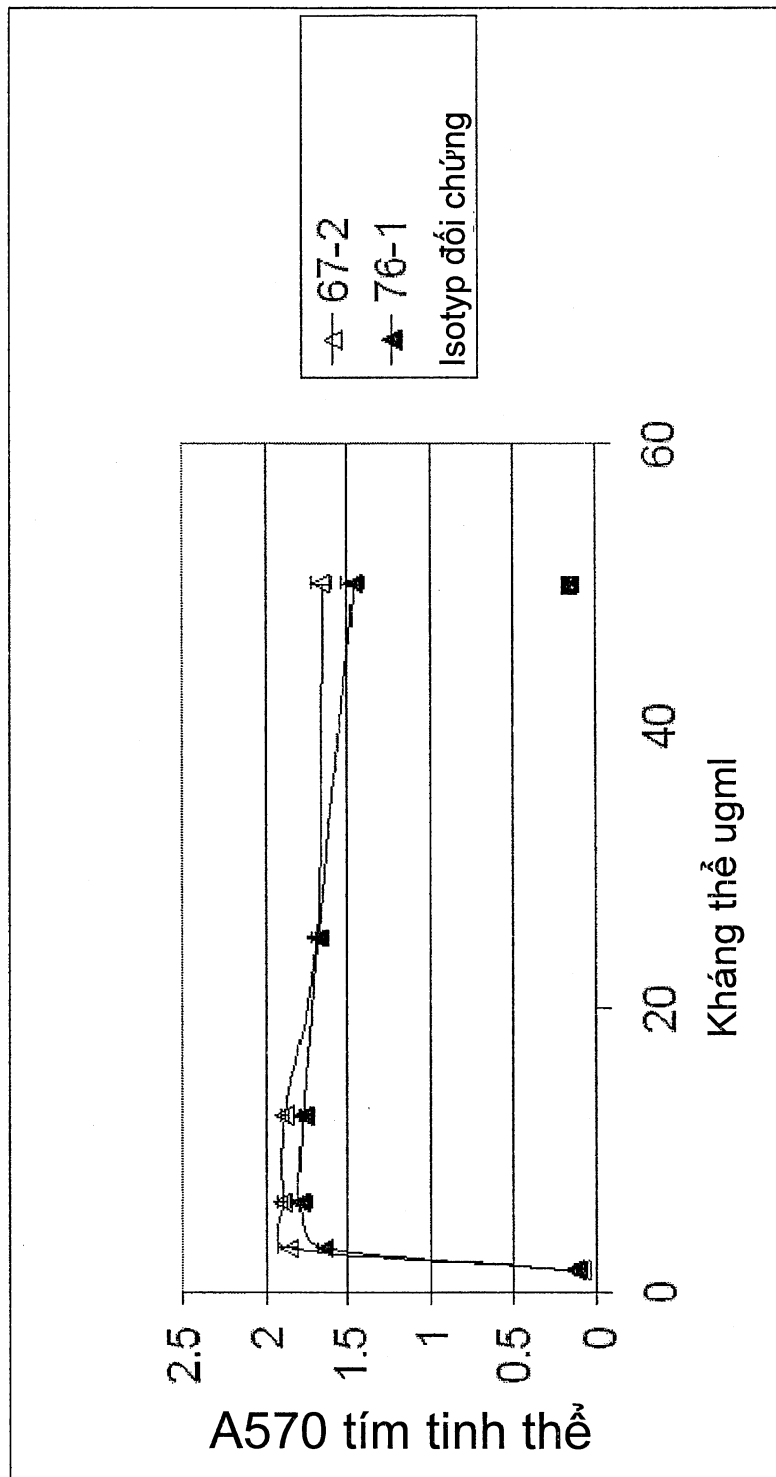


FIG. 3

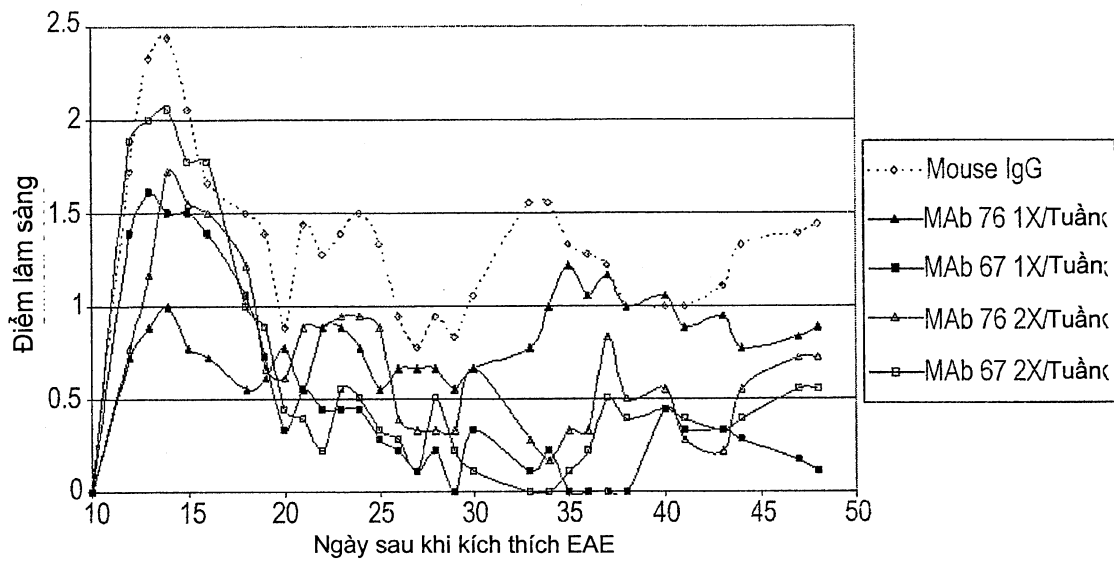


FIG. 4A

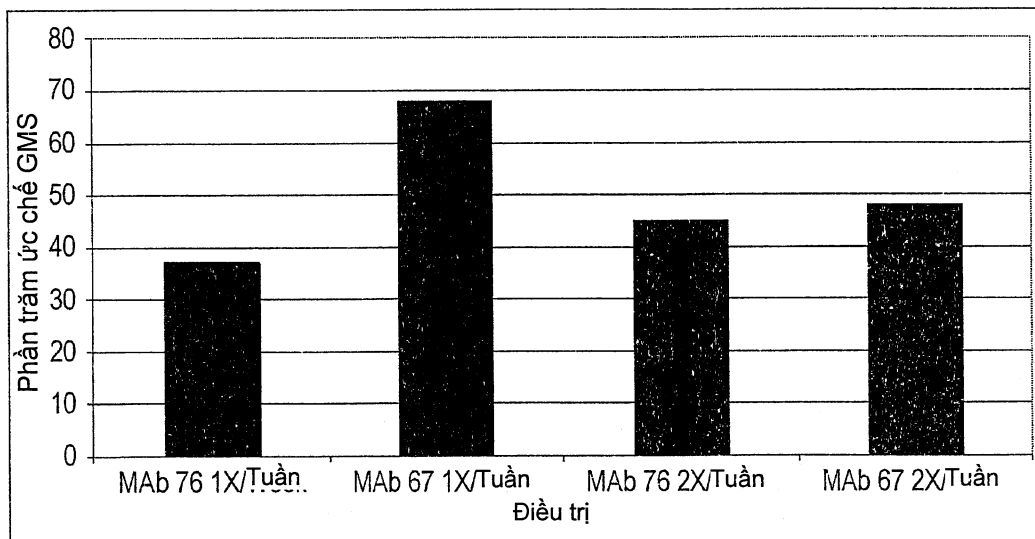


FIG. 4B

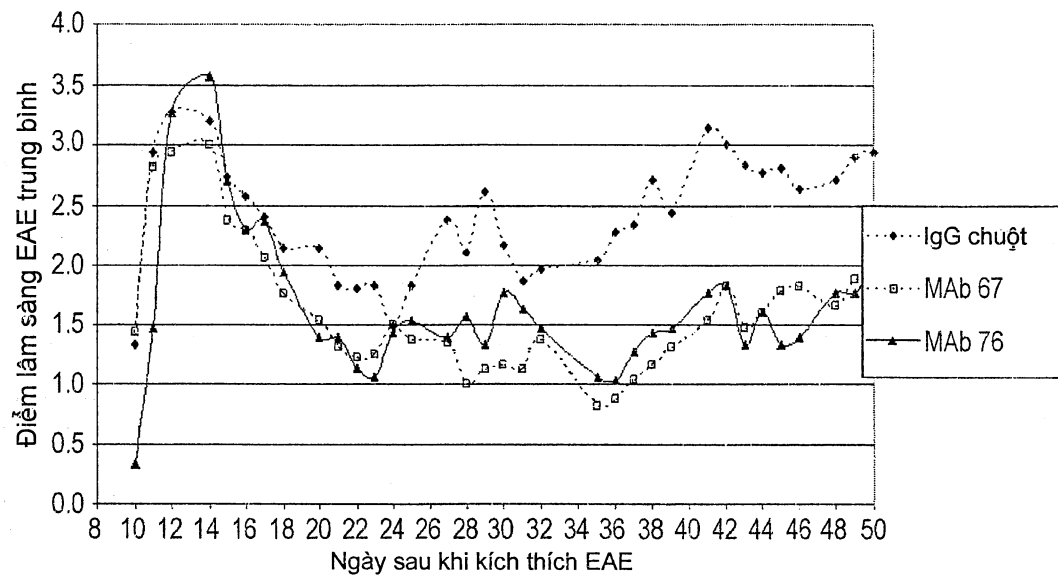


FIG. 5A

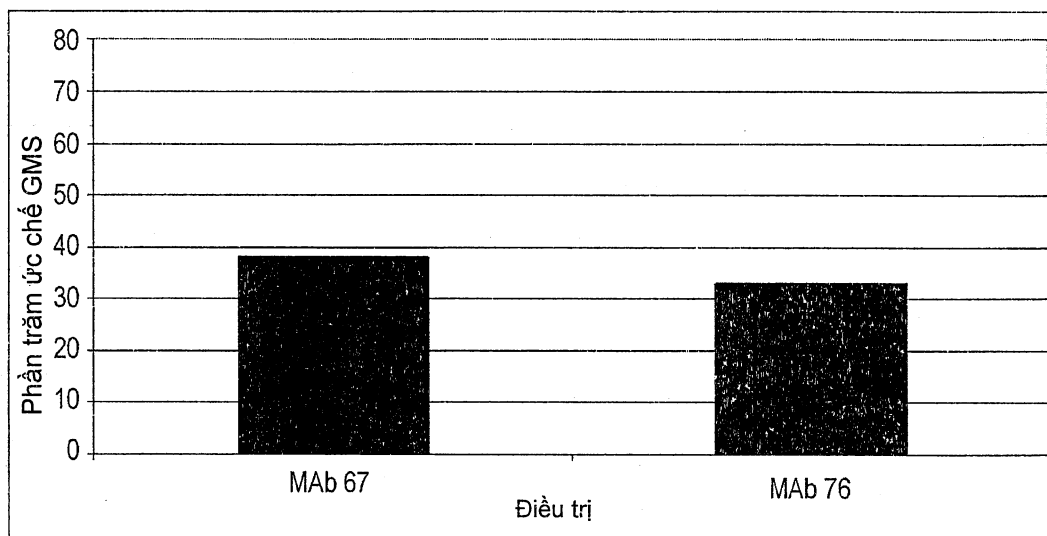
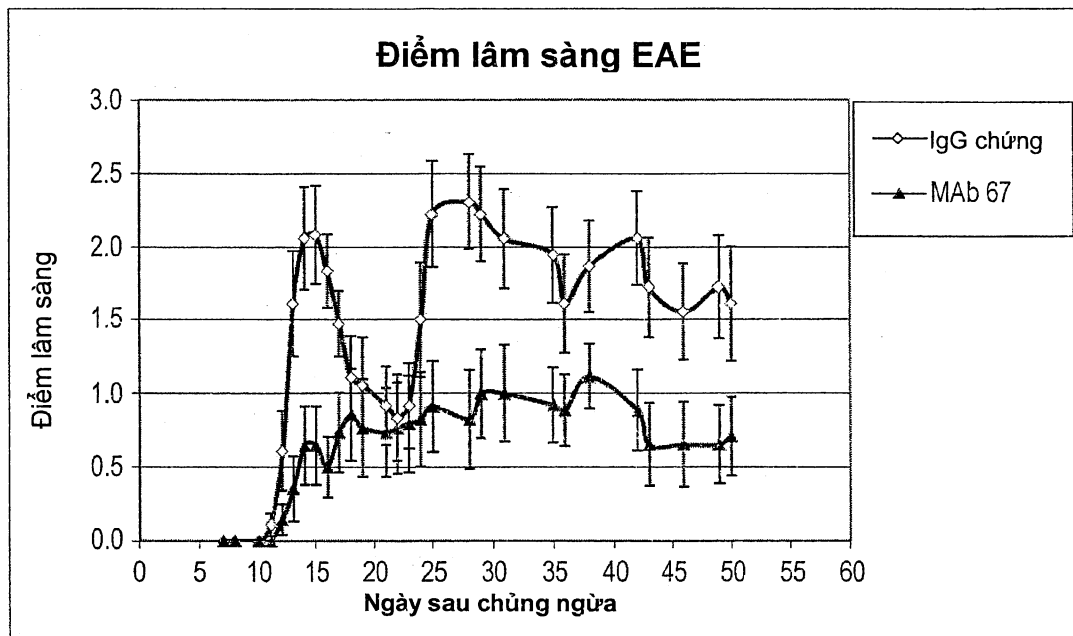


FIG. 5B

**FIG. 6**

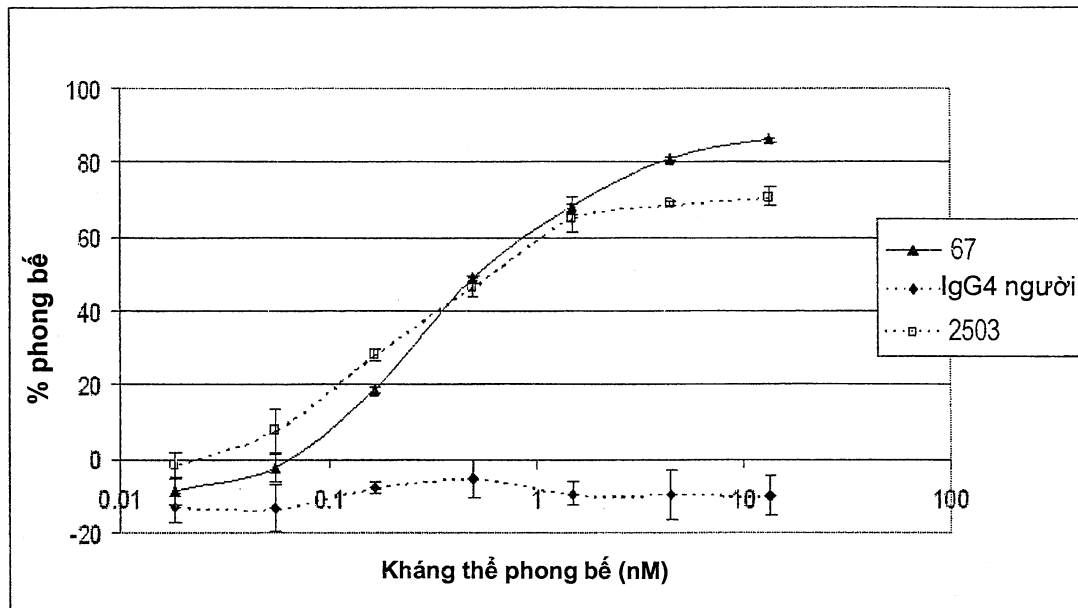


FIG. 7A

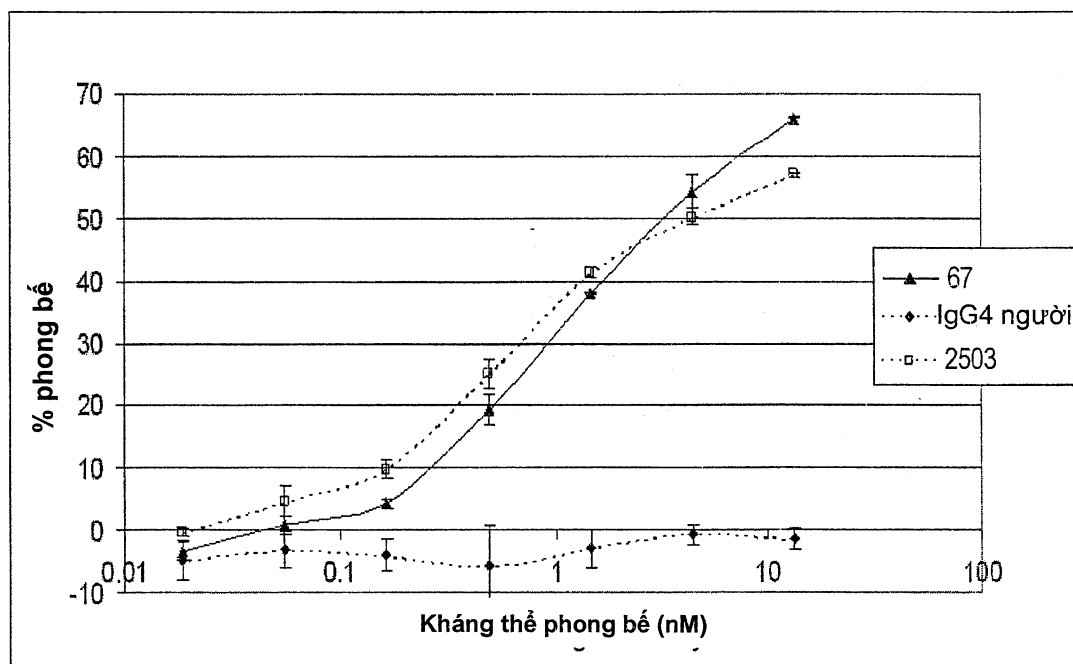
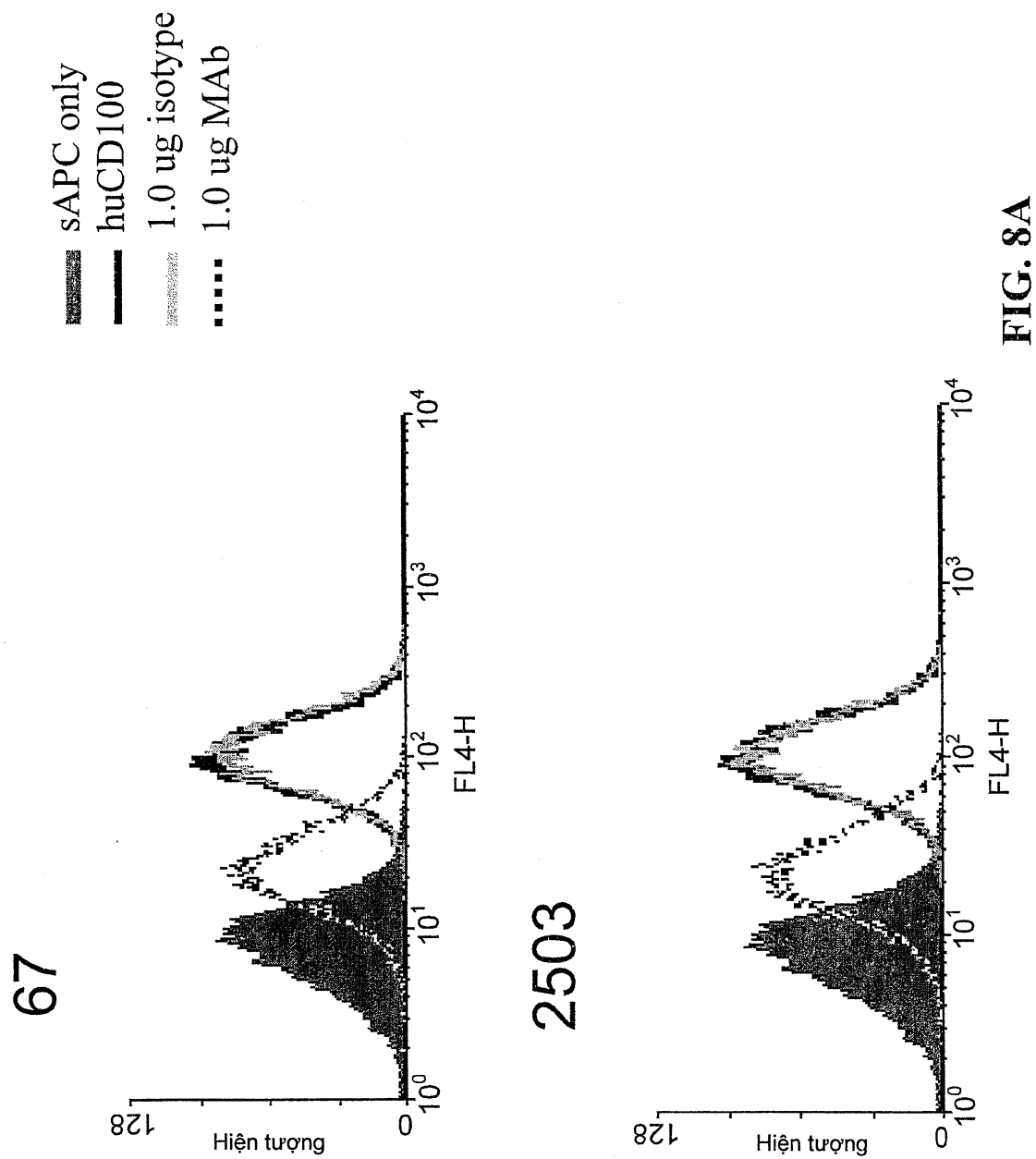
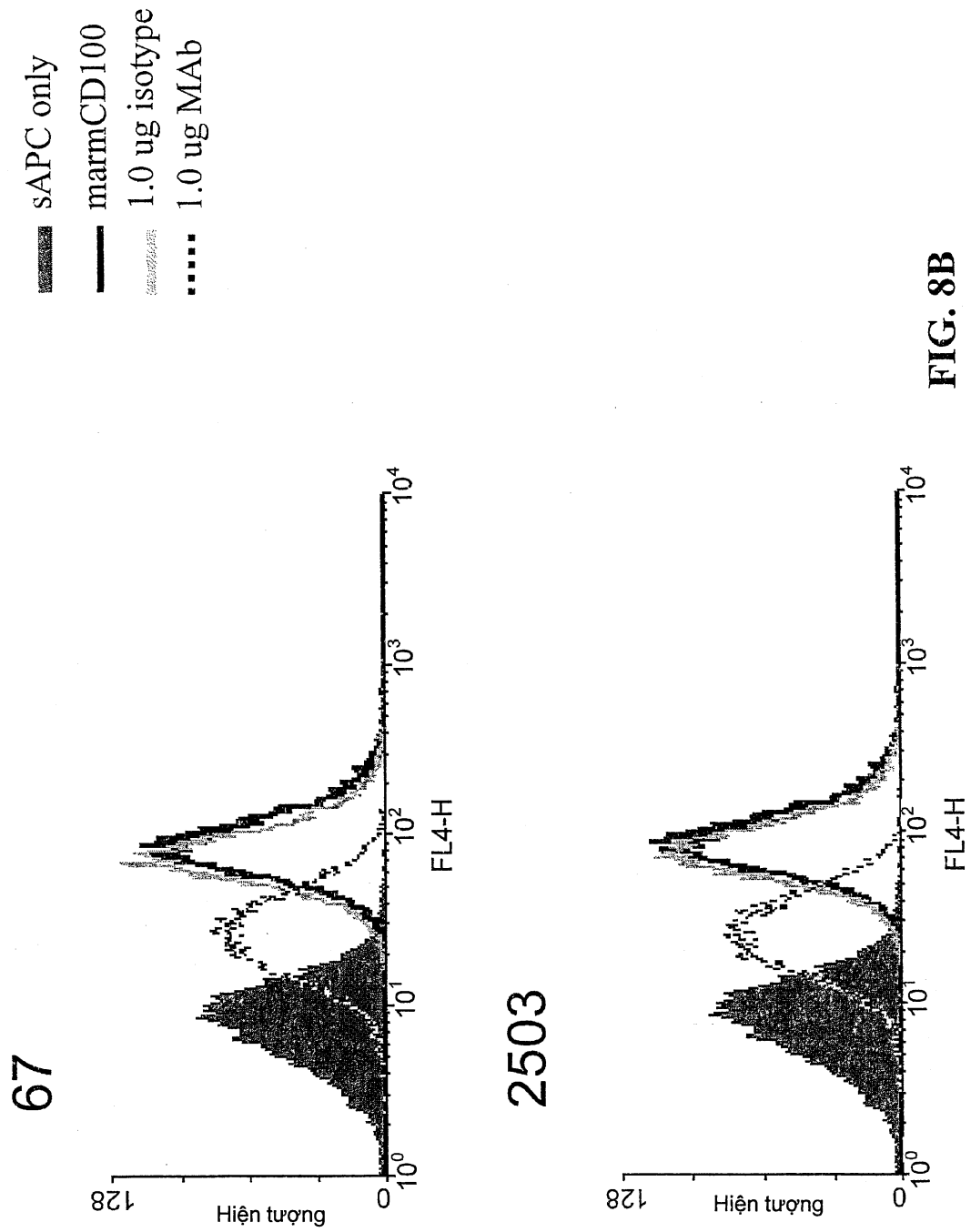
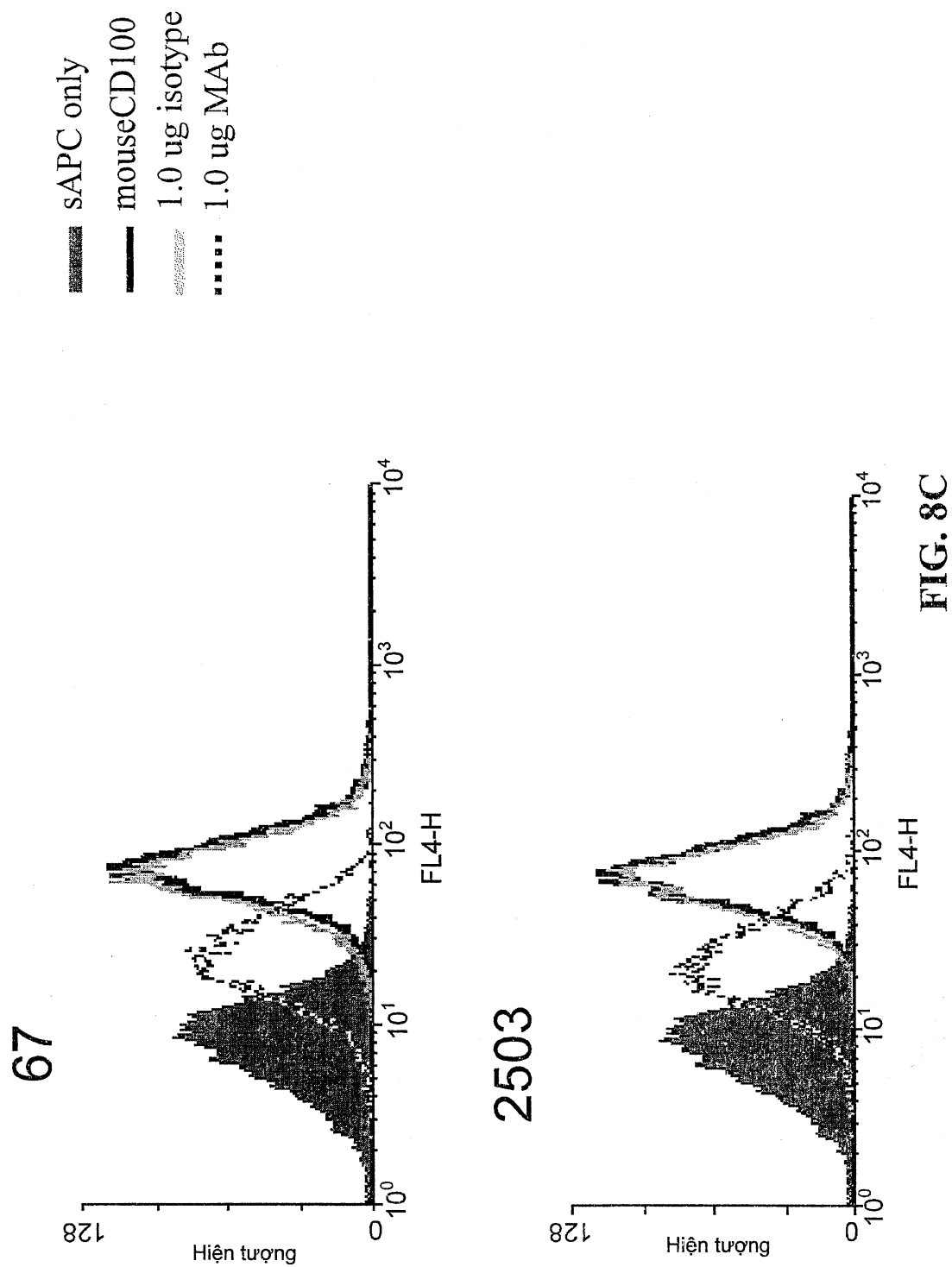


FIG. 7B







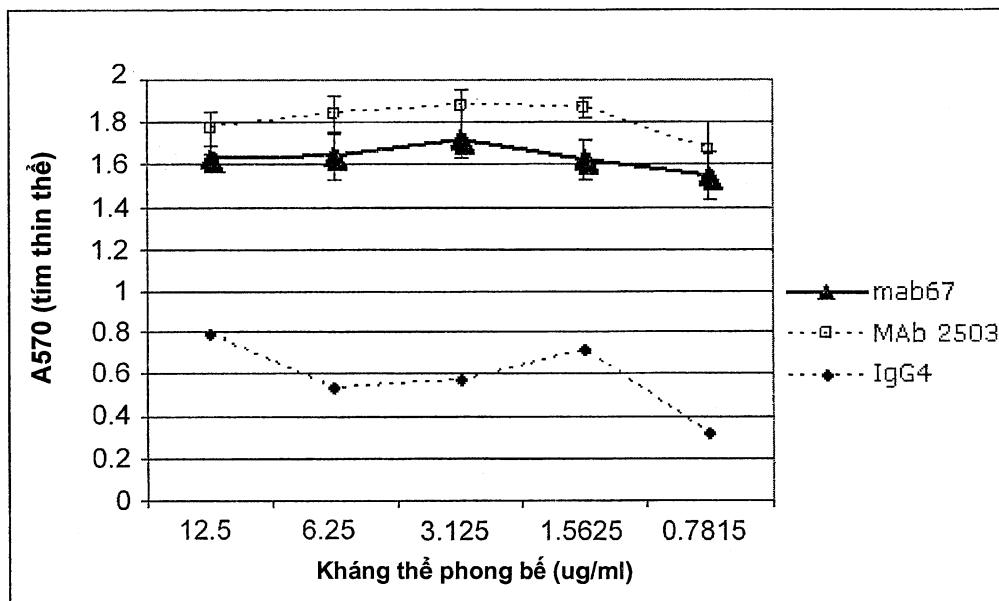


FIG. 9A

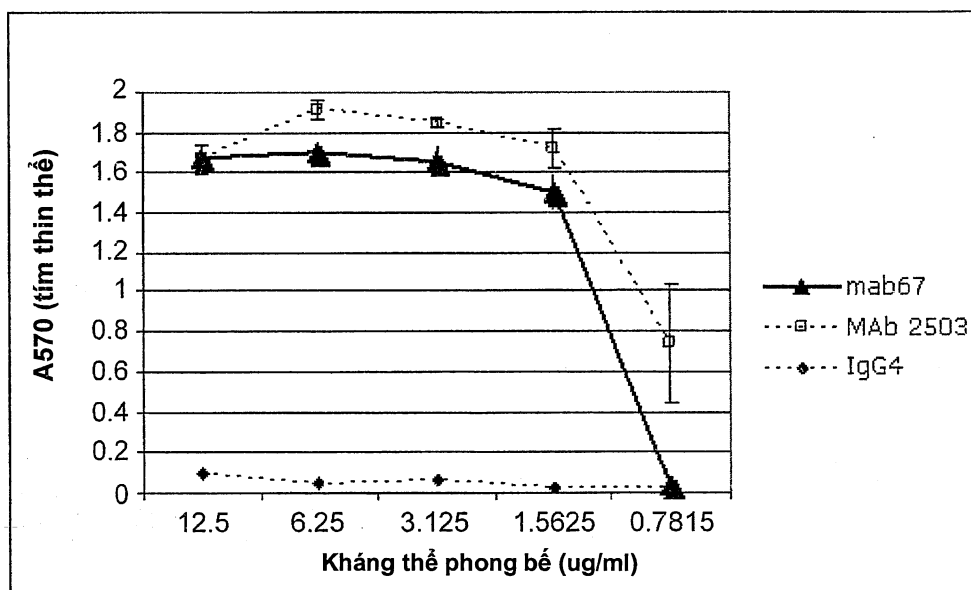


FIG. 9B

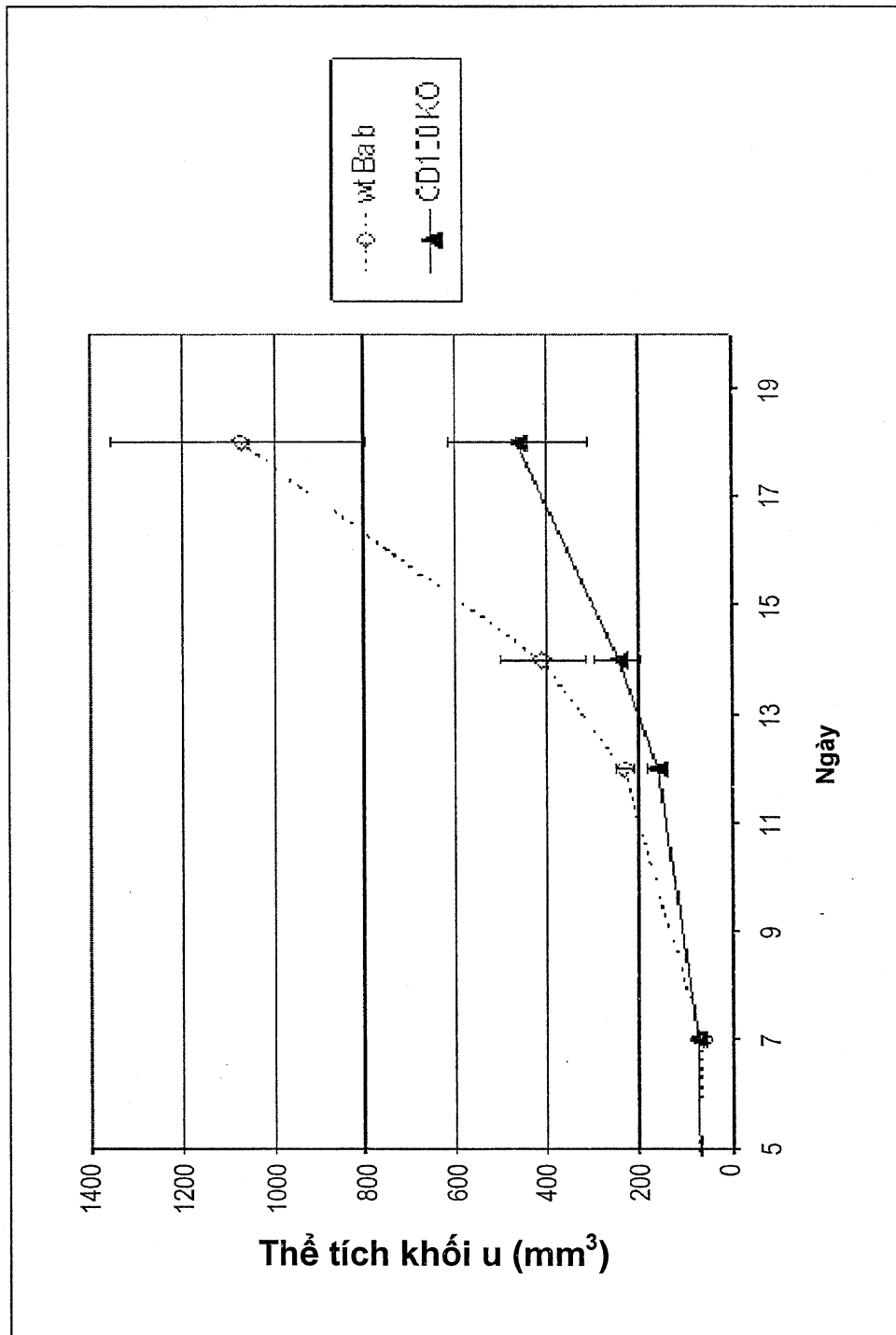


FIG. 10

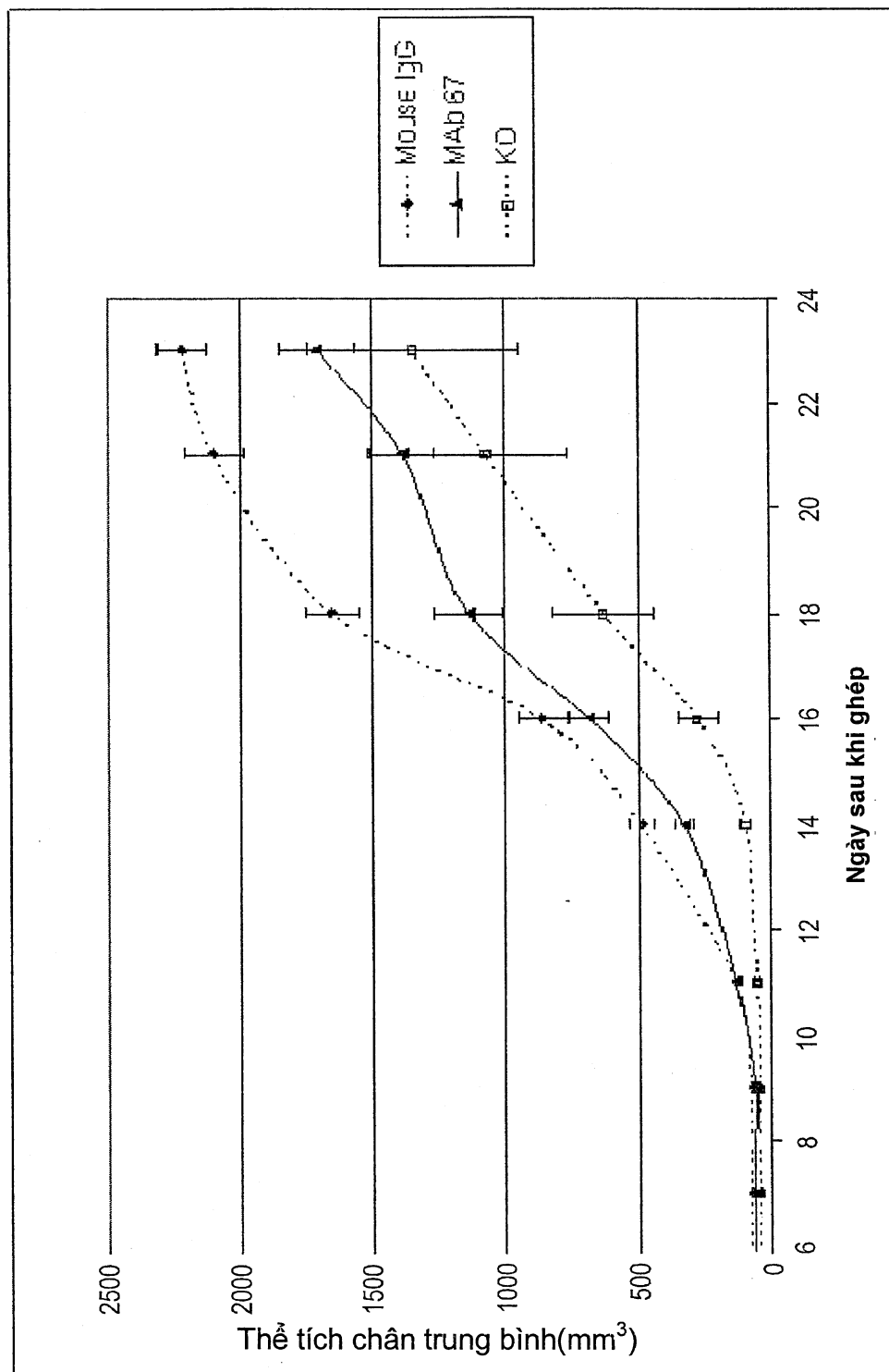


FIG. 11

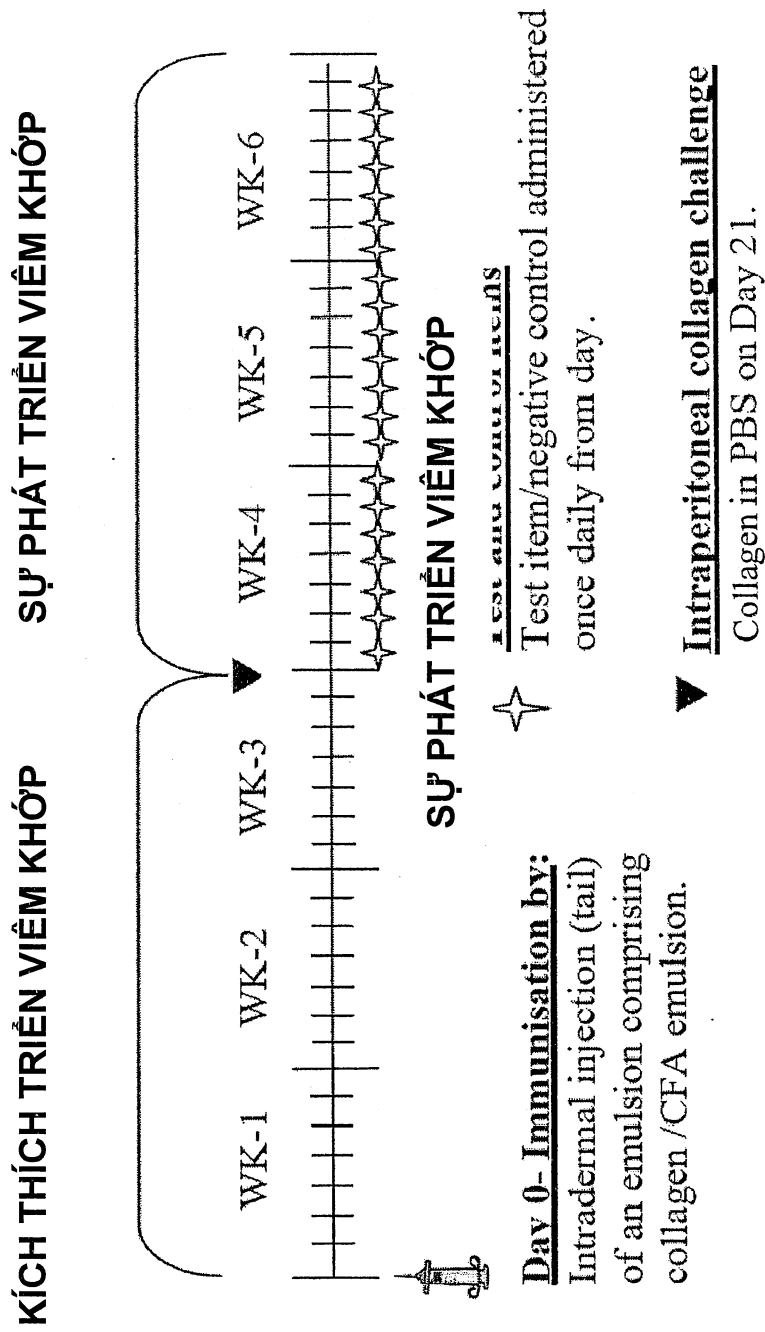


FIG. 12

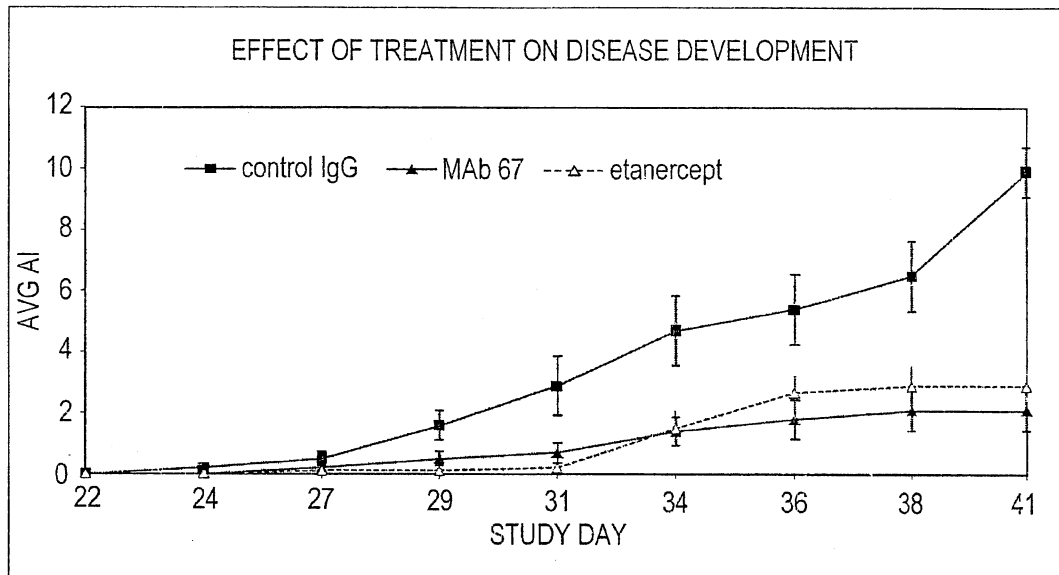


FIG. 13A

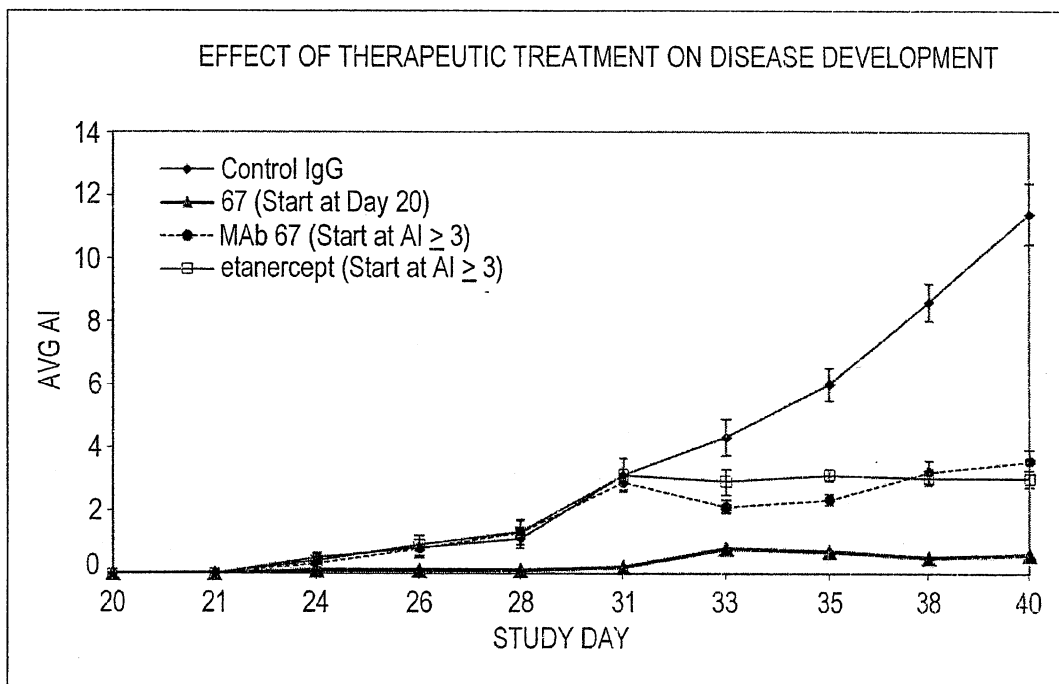


FIG. 13B

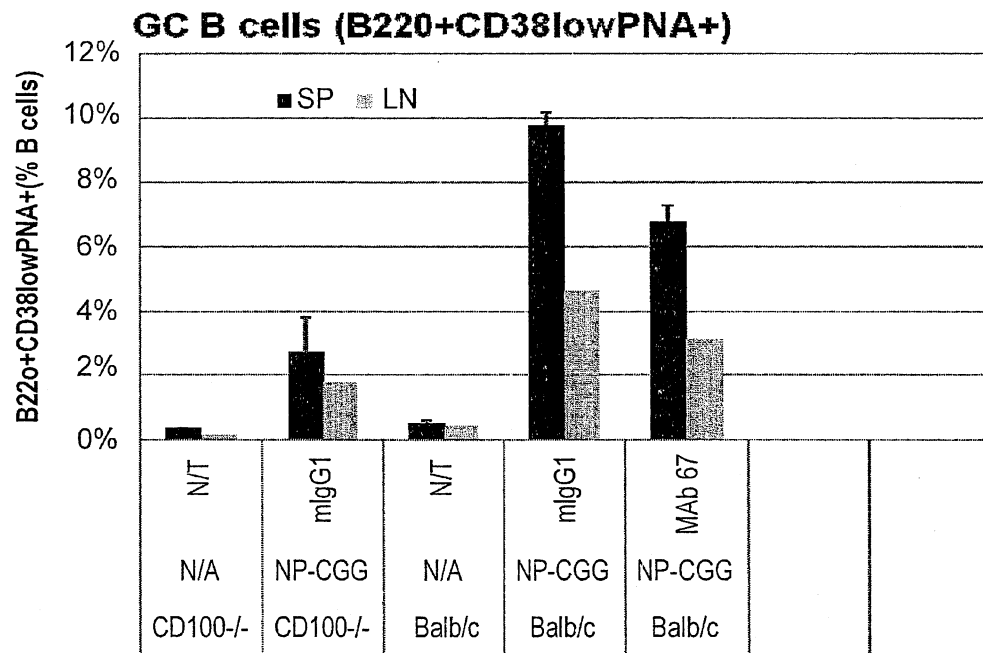


FIG. 14A

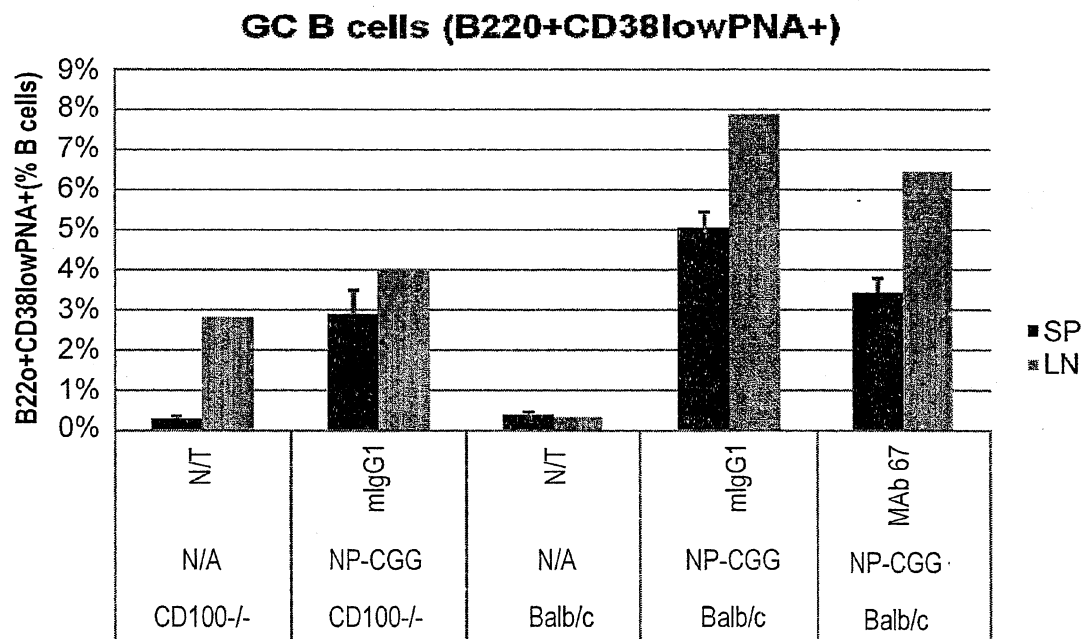
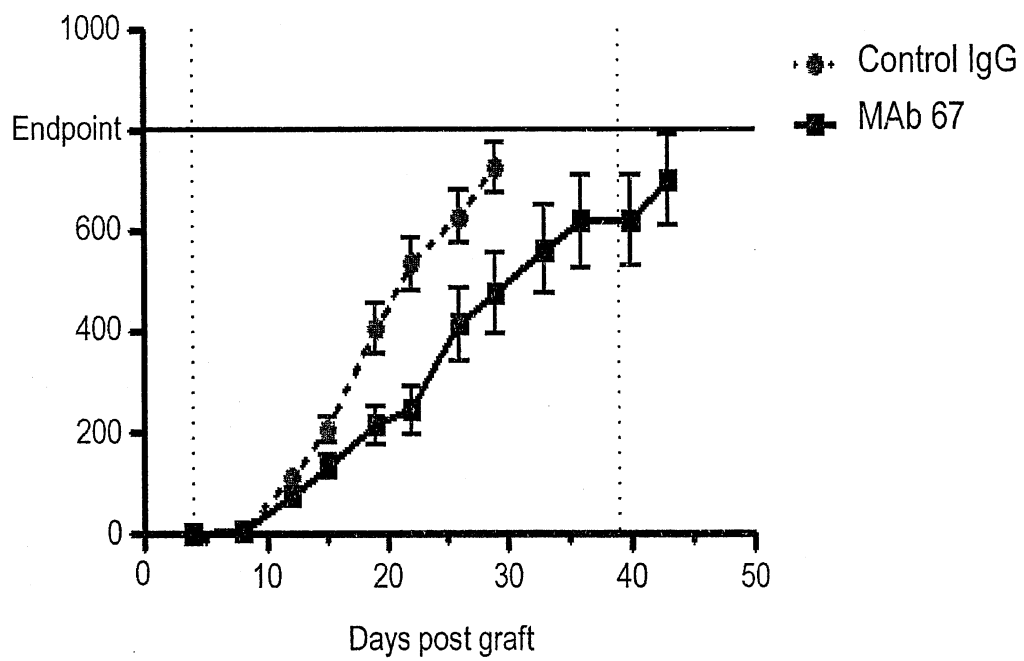


FIG. 14B

**FIG. 15**

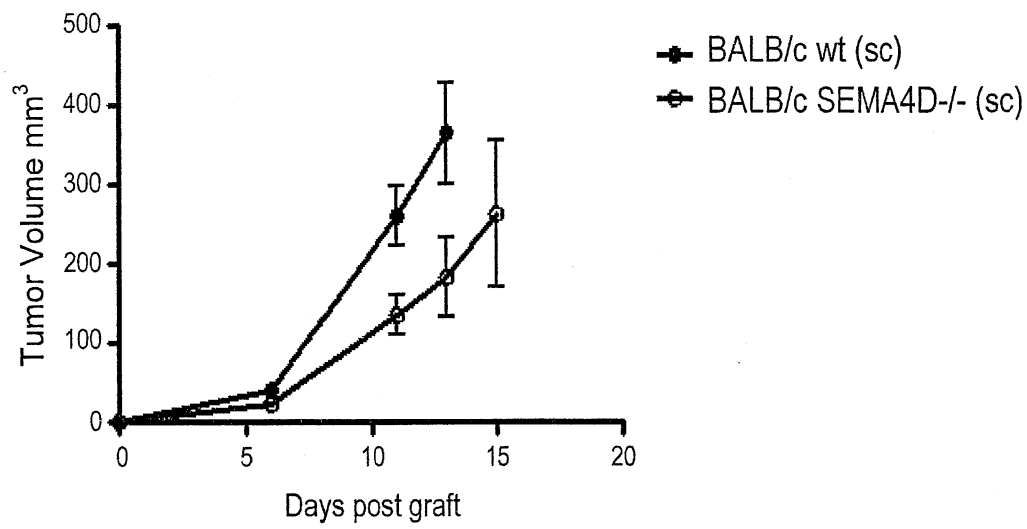


FIG. 16A

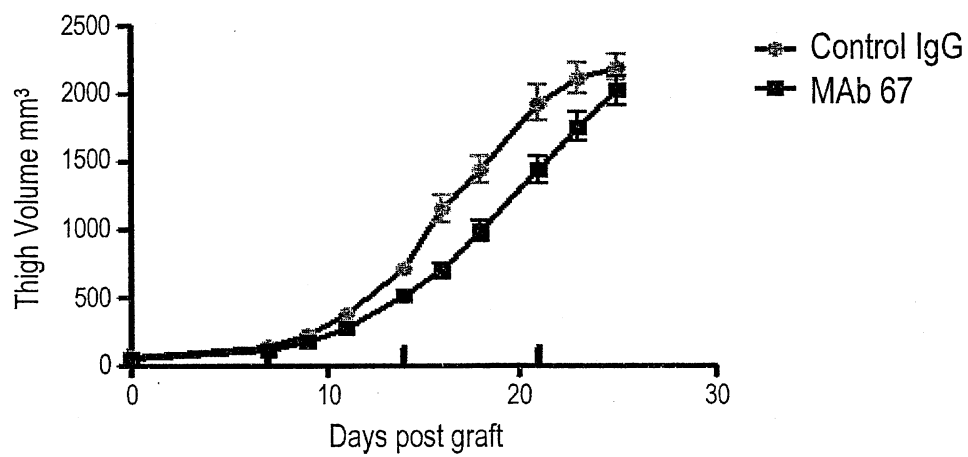
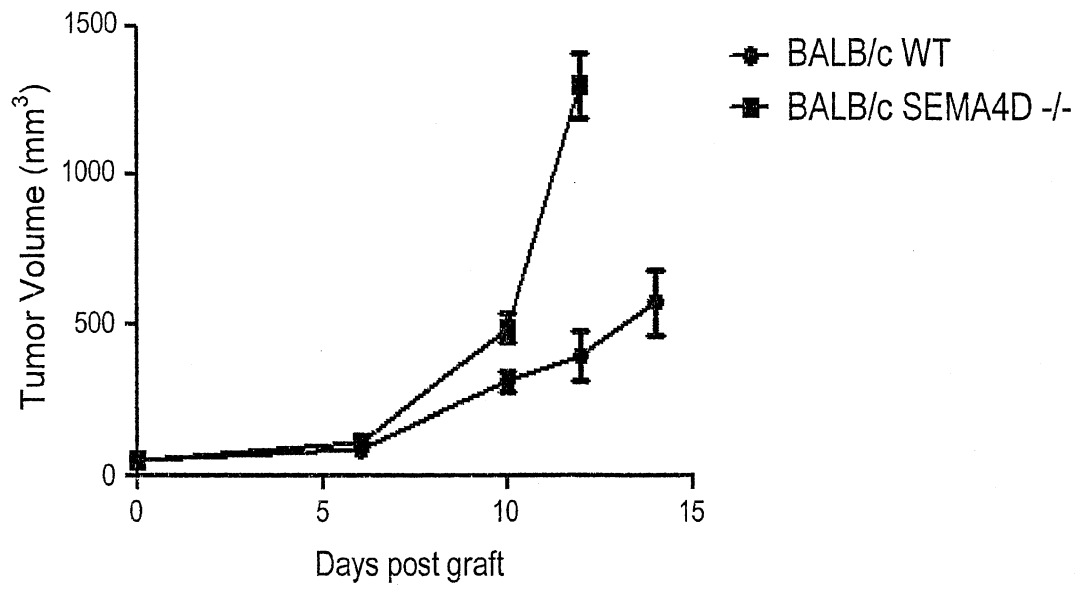
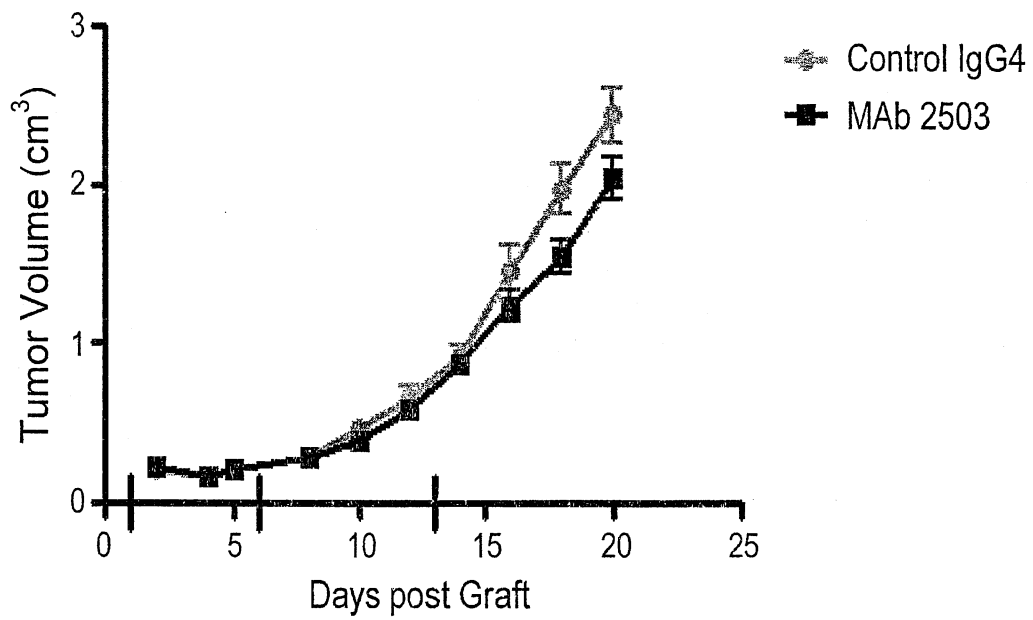


FIG. 16B

**FIG. 17**

**FIG. 18**

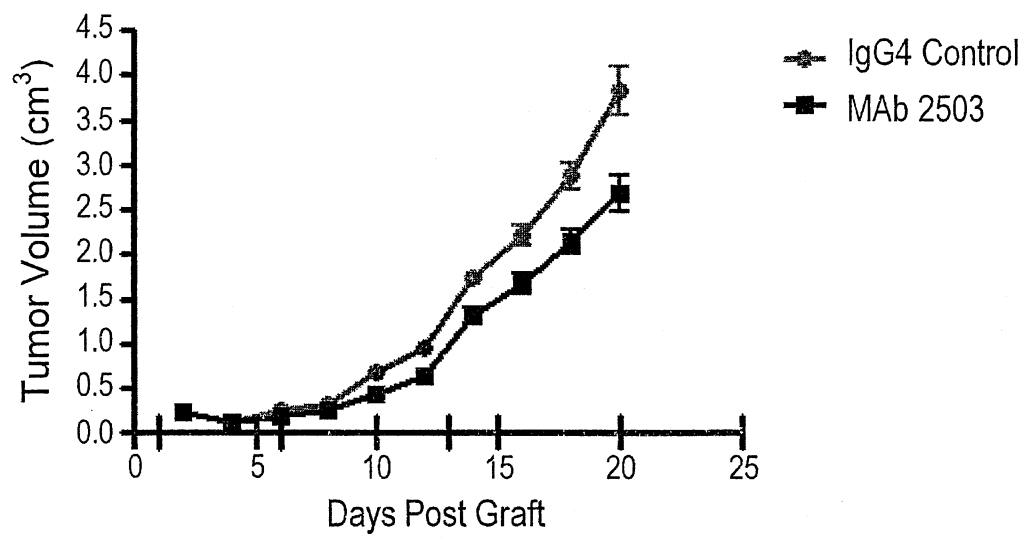


FIG. 19A



FIG. 19B

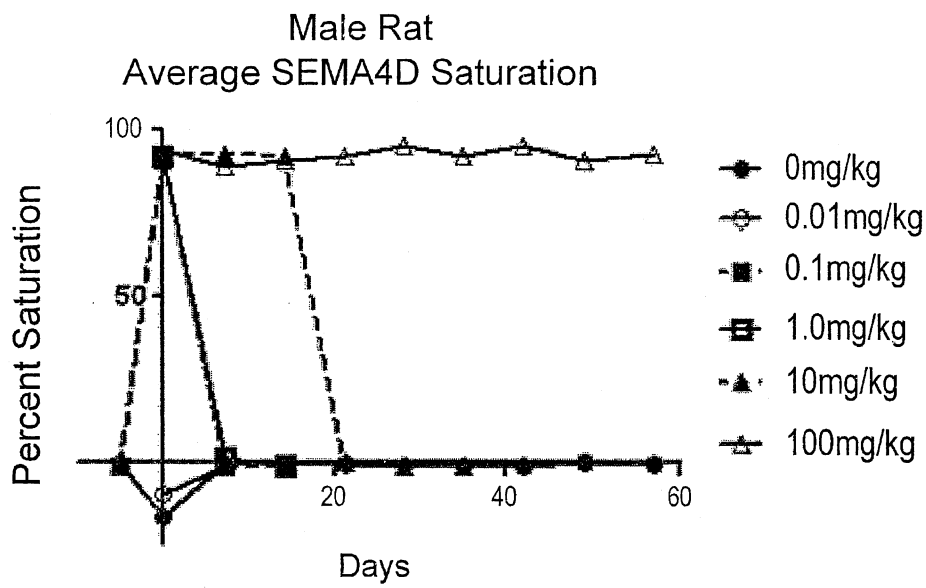


FIG. 20A

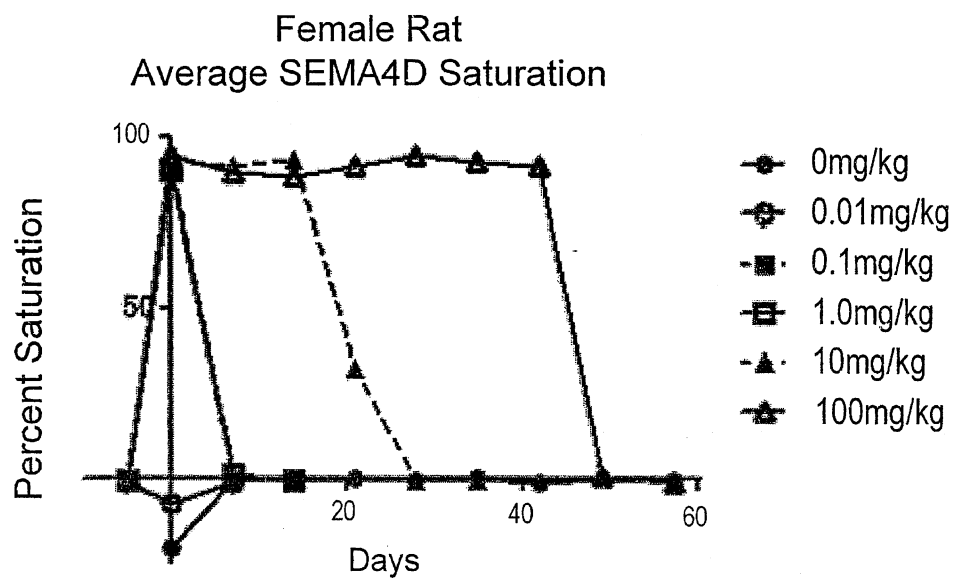


FIG. 20B

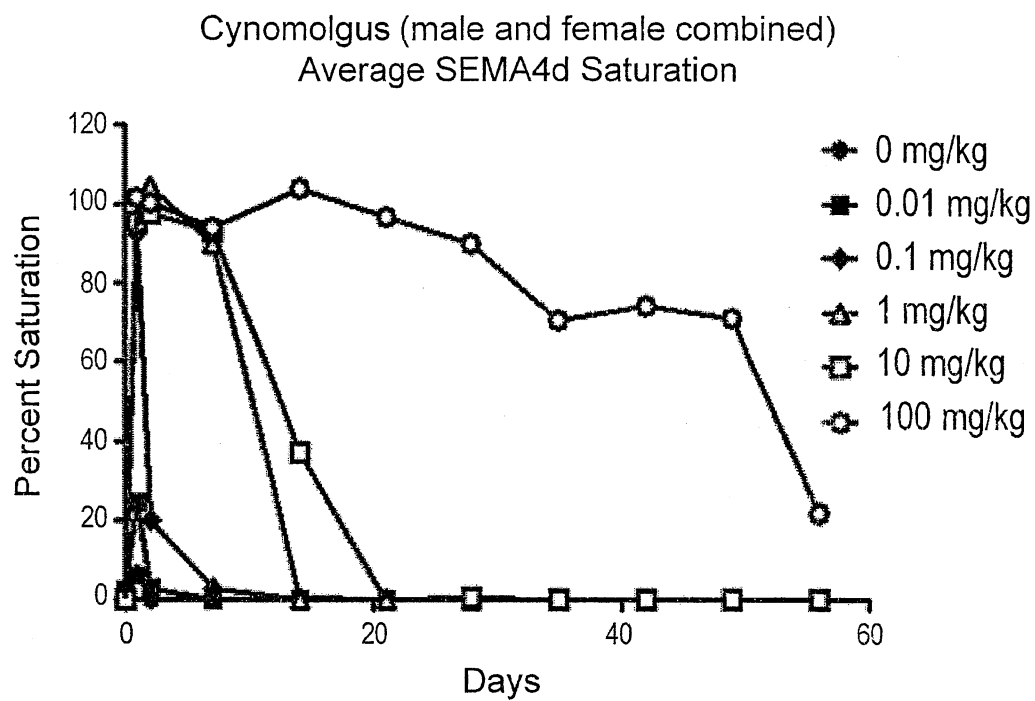


FIG. 21